

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 5 月 17 日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/34785 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/48, 15/57, 5/10, C07K 16/40,
C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07917

(22) 国際出願日: 2000 年 11 月 10 日 (10.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/321740

1999 年 11 月 11 日 (11.11.1999) JP

特願平 2000-144020

2000 年 5 月 16 日 (16.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP). 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那 1532 番 3 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山地 昇 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]. 西村 耕一 (NISHIMURA, Kouichi) [JP/JP]. 阿部 邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP];

〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘 21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 小原 収 (OHARA, Osamu) [JP/JP]; 〒292-0801 千葉県木更津市請西二丁目 20 番 25 号 Chiba (JP). 長瀬 隆弘 (NAGASE, Takahiro) [JP/JP]; 〒292-0042 千葉県木更津市清見台南二丁目 6 番 5 号 Chiba (JP). 野村 信夫 (NOMURA, Nobuo) [JP/JP]; 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台五丁目 2 番 11 号 Chiba (JP).

(74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目 17 番 1 号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: NOVEL METALLOPROTEASE HAVING AGGREGANASE ACTIVITY

(54) 発明の名称: アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

(57) Abstract: A novel metalloprotease having an aggrecanase activity which causes joint diseases; a gene encoding this metalloprotease; a promoter of the above metalloprotease; a method of screening a drug with the use of the above metalloprotease; and compositions for inhibiting the degradation of proteoglycans which contain as the active ingredient a substance inhibiting the aggrecanase activity of the above metalloprotease.

(57) 要約:

本発明は関節疾患の原因となる、アグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ、該金属プロテアーゼをコードする遺伝子、該金属プロテアーゼのプロモーター、該金属プロテアーゼを用いた医薬のスクリーニング法、該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用組成物を提供する。

WO 01/34785 A1



一 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼ

技術分野

本発明は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する新規金属プロテアーゼ（以下、「関節疾患アグリカナーゼ」とする）、該「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、該「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、該「関節疾患アグリカナーゼ」を用いた、アグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、該アグリカナーゼ活性を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、及び該「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子に関するものである。

背景技術

関節疾患は、関節軟骨の損傷・変性を主病変とする疾患である。関節疾患の中で最も患者数の多い疾患は変形性関節症（OA）であるが、現行の治療法においては鎮痛消炎剤やヒアルロン酸製剤が軟骨変性・軟骨下骨破壊に伴う痛みを軽減する目的で対症療法的に用いられているに過ぎず、十分な治療効果を上げているとは言えない状況にある。

関節軟骨は主に II 型コラーゲンと軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンから構成される組織であり、関節疾患では両者の分解・変性が観察されている。そのため、古くよりこれら細胞外マトリクス成分の分解・変性の制御が関節疾患の治療に繋がると考えられており、分解に関与するプロテアーゼ（コラゲナーゼ、アグリカナーゼ）の同定、そして、それらに対する阻害剤の探索、医薬品としての開発の試みが精力的に行われてきた。

コラゲナーゼ活性を有するプロテアーゼとしてはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP1、MMP8、MMP13、MMP14 等) が同定され、それぞれの選択的阻害剤が発見されていた。しかしながら、多数のコラゲナーゼ阻害活性を有する MMP 阻害剤を OA、リウマチ性関節炎 (RA) を含む関節疾患治療薬として開発する動きがあったにもかかわらず、これらの疾患を適応症とする MMP 阻害剤は上市されていなかった。このような状況下、関節軟骨のもう一つの主要構成成分であるアグリカンを選択的に分解するアグリカナーゼが注目された。

アグリカンの Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間を切断する酵素アグリカナーゼが関節疾患に関与することは、Sandy らや Lohmander らのヒト関節疾患患者の滑液中に検出される主要なアグリカン分解断片がいずれもアグリカナーゼ切断部位での切断により生じているとした論文で明らかにされていた (Sandy J. D. et al, J Clin. Invest. 89, 1512-1516, 1992; : Lohmander L. S. et al, Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993)。一方、関節軟骨の体外移植培養系において、IL-1 誘導により、まずアグリカンの分解が起こり、続いて II 型コラーゲンの分解が亢進することが知られていた (Dingle L. T. et al., Ann. Rheum. Dis. 34, 303-311, 1975; Cawston T. E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 215, 377-385, 1995; Kozaci L. D. et al., Arthritis Rheum. 40, 164-174, 1997)。マウス関節炎モデルにおいてもアグリカン分解が II 型コラーゲン分解に先行することが報告されていた (van Meurs J. B. et al., Arthritis Rheum., 42, 1128-1139, 1999)。これらのことは、先行するアグリカン分解を阻害することにより II 型コラーゲン分解をも制御しうる可能性を示唆していた。

ところが、金属プロテアーゼであること、細胞外に存在すること、基質認識に糖鎖の関与があること、IL-1、TNF、レチノイン酸で活性が誘導されること等の生化学的性質が分かっていたにも係わらず、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ (「関節疾患アグリカナーゼ」) の本体は長い間不明のままであった。最近になり、ADAMTS4 (aggrecanase-1: Tortorella M. D. et al., Science., 284,

1664-1666, 1999)、ADAMTS11 (aggrecanase-2: Abbaszade I, et al., J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999) がアグリカナーゼ活性を有するプロテアーゼとして報告された。しかし、これらはヒトOA軟骨で遺伝子発現増強されておらず、また、ヒト膝関節軟骨の体外移植培養系において、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を誘導する IL-1、TNF、レチノイン酸で遺伝子発現誘導されないことから、「関節疾患アグリカナーゼ」ではないことが判明した。

(Flannery C. R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 318-322, 1999)。上述の通り、「関節疾患アグリカナーゼ」は、未だ取得されていない。

本発明の開示

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、「関節疾患アグリカナーゼ」である、アグリカナーゼ活性を有する新規な金属プロテアーゼをコードする遺伝子を単離し、全長 ORF 配列を決定して、組み換え蛋白の生産を可能にすることに成功した。

さらにまた、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同新規蛋白の製造法を確立した。

また、本発明者らは、該蛋白を用いたスクリーニング法を提供し、当該スクリーニング法を実施し、選択された化合物が「アグリカナーゼ活性」(即ち、該蛋白が有する細胞外基質アグリカンで Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間で選択的に切断する活性)を有意に阻害し、関節疾患の予防及びまたは治療に有用な医薬品となり得ることを見出した。

さらに関節疾患の予防及びまたは治療用医薬品のスクリーニングに有用な、該蛋白のプロモーター遺伝子を単離し、本発明を完成させた。

即ち本発明は、

[1] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸

配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔２〕配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第５８３番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔３〕配列番号１で表されるアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第６８７番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第１番から第５８３番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第９５０番のアミノ酸配列、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第６８７番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号１で表されるアミノ酸配列の第２１３番から第５８３番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物、

〔４〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子、

〔５〕〔４〕に記載の遺伝子を含むベクター、

〔６〕〔５〕に記載のベクターを含む宿主細胞、

〔７〕〔６〕に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法、

〔８〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体、

〔９〕〔１〕乃至〔３〕の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、

[10] [1] 乃至 [3] に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物、

[11] 配列番号 24、25、26、27、28、29、30 若しくは 31 で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物、

に関する。

あるいは本発明は、プロテオグリカン分解抑制用医薬の製造における、[1] 乃至 [3] の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアグリカナーゼ活性を阻害する物質の使用に関する。

さらに本発明は、[9] に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、当該アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質の、関節疾患治療における使用に関する。

また、本発明は[11] に記載の遺伝子を用い、当該遺伝子のプロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法に関する。

発明の実施の形態

以下、本発明で使用される用語につき説明する。本明細書中で使用される「アグリカナーゼ」は、亜鉛配位コンセンサス配列(HE_{xx}H)を有し、かつ、関節軟骨に存在するアグリカンを Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間で選択的に切断する活性、即ち「アグリカナーゼ活性」を有する金属プロテアーゼを意味する。また、「アグリカナーゼ」は断りがない限り、「蛋白」を表す。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物ならいずれでもよい。

また、好ましくは本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

さらに好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物である。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物」とは、(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含む金属プロテアーゼの同効物の場合、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、(3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸

配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の起源はヒトに限定されない。例えば、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼが含まれる。また、配列番号 1 に記載した「関節疾患アグリカナーゼ」の配列を基にして、遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白などが含まれる。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、上記の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、即ち、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

さらに、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配

列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するを含むアグリカナナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子ならいずれでもよい。

ここで、「金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子」とは、（１）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（２）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位において、1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、（３）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼの同効物をコードする遺伝子の場合、それぞれの配列の中のいずれかの 1 乃至複数個（好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個）の部位におい

て、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていてかつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼをコードする遺伝子、である。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子として好ましくは、配列番号2記載の塩基配列の1番から1749番、1番から2061番、1番から2850番、637番から1749番、637番から2061番、若しくは637番から2850番を有する遺伝子であり、特に好ましくは配列番号2記載の塩基配列の637番から1749番、637番から2061番、637番から2850番を有する遺伝子である。

本発明のプロモーター遺伝子は、好ましくは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列を有する遺伝子である。「配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の遺伝子の同効物」とは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の部位において、1乃至複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、「関節疾患アグリカナーゼ」プロモーター活性を有する遺伝子である。「プロモーター活性」とはDNA鎖の情報をRNA鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味する。

GENBANK 及び SwissProt の BLAST (Basic local alignment search tool) (S. F. Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410) 検索結果によれば、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の1つであるMDTS6のアミノ酸配列（配列番号1）（950アミノ酸）、及び、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号2）（2853塩基対）は新規である。前述のADAMTS4、ADAMTS11とアミノ酸配列でのホモロジー検索を行ったところ、配列同一性は50%以下であった。

また、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する金属プロテアーゼと相同性の高い、アグリカナーゼ活性を

有する金属プロテアーゼが含まれる。相同性の高い、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼとは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上の配列同一性を示すアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼである。相同性は前述のBLAST検索アルゴリズムを用いて特定することができる。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」は、関節疾患の原因となるアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる。該アグリカナーゼ活性を阻害する物質は、プロテオグリカン分解抑制用組成物として有用である。

加えて、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子はプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングに使用することができる点が注目される。本明細書において「プロモーター活性を阻害する物質」とは、プロモーターとしての働きを抑え、「関節疾患アグリカナーゼ」の発現を抑制する物質を意味する。本発明には該アグリカナーゼのプロモーター遺伝子を用いたプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする方法、及び当該プロモーター活性を阻害する物質の関節疾患予防及びまたは治療のための使用が含まれる。さらには、「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子には複数の変異体、すなわち遺伝子多型が存在する。したがって、該遺伝子多型と関節疾患を含む該アグリカナーゼの関与が想定される疾患との相関解析に用いられ、結果として、遺伝子診断のマーカーとして用いられる可能性がある。

ここで、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」をコードする遺伝子、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」の製造方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を検出する方法、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」に反応する抗体の製造方法、本発

明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法、プロモーター活性を検出する方法、プロモーター活性を修飾する物質のスクリーニング方法を以下の1)～7)に記載する。本発明には1)～7)に記載する事項全てを包含する。以下、1)～7)では「関節疾患アグリカナーゼ」を「蛋白」として説明する。

1) 蛋白遺伝子の製造方法

a) 第1製造法—PCRを用いた方法

本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から mRNA を抽出する。次いでこの mRNA を鋳型として該新規蛋白 mRNA または一部の mRNA 領域をはさんだ2種類のプライマーを作製する。denature 温度、変性剤添加条件などを改良し、本発明の配列番号1で表されるアミノ酸配列の一部を含む蛋白のそれぞれに適した逆転写酵素—ポリメラーゼ連鎖反応（以下 RT-PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。もしくは、本発明の新規蛋白を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から調製した mRNA から逆転写酵素により作製した cDNA あるいは市販の該ヒト細胞あるいは組織由来の cDNA を鋳型とした、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR という）を行うことにより、該新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規蛋白の全長 cDNA またはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該新規蛋白を製造することができる。

まず、本発明の新規蛋白の産生能力を有する細胞あるいは組織から該プロテアーゼをコードするものを包含する mRNA を既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート—グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該プロテアーゼの産生能力を有する細胞あるいは組織は、該プロテアーゼをコードする塩基配列を有する

遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該プロテアーゼに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNA の精製は常法に従えばよく、例えば mRNA をオリゴ (d T) セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等により mRNA をさらに分画することもできる。また、mRNA を抽出せずとも、市販されている抽出精製済みの mRNA を用いても良い。

次に、精製された mRNA をランダムプライマー、オリゴ d T プライマーまたはカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第 1 鎖 cDNA を合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第 1 鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いて PCR に供し、目的とする新規蛋白 DNA を増幅する。また、cDNA を合成せずとも、市販の cDNA を用いてもよい。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記 DNA を制限酵素等で切断し、接続することによって目的とする DNA 断片を得ることもできる。

b) 第 2 製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得た mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した後、この 1 本鎖 cDNA から 2 本鎖 cDNA を合成する。その方法としては S 1 ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al., Cell, 7, 279-288, 1976)、Land 法 (Land, H. et al., Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo 法 (Yoo, O. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、Okayama-Berg 法 (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982) などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えば DH5 α 株、HB101 株、JM109 株等に導入して形質転換させて、テトラサイクリン、アンピシ

リン、カナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には Hanahan の方法 (Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち CaCl_2 や MgCl_2 または RbCl を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換え DNA 体を加える方法により実施することができる。もちろん、市販のコンピテント細胞を使用しても構わない。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規蛋白の DNA を有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

①合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し (この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ (^{32}P 又は ^{33}P で標識する) として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターやナイロンフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。

②ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明の新規蛋白の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 (Saiki, R. K. et al., Science 239, 487-491, 1988) を行い、目的の新規蛋白の全部又は一部をコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、該新規蛋白を産生する細胞の mRNA より逆転写反応にて合成した cDNA、またはゲノム DNA を用いることができる。このようにして調製した DNA を断片を ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼ

ーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

③他の動物細胞で新規蛋白を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞外に産生させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて該新規蛋白を検出することにより、元の形質転換株より目的の新規蛋白をコードする cDNA を有する株を選択する。

④本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNA を発現ベクターに組み込み、形質転換株の培養上清、細胞内もしくは細胞表面に蛋白を産生させ、本発明の新規蛋白に対する抗体および該抗体に対する 2 次抗体を用いて、所望の新規蛋白産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤セレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られる cDNA を、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、本発明の新規蛋白産生細胞からの mRNA をハイブリダイズさせた後、cDNA に結合した mRNA を解離させ、回収する。回収された mRNA を蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明の新規蛋白に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明の新規蛋白をコードする DNA を採取する方法は、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マ

ニュアルに従い実施できる。例えば細胞よりプラスミド DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より cDNA 領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA は、DNA 合成機 [例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社製)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社製) など] を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明の新規蛋白遺伝子は、新規蛋白の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 10, 105-111, 1984) 等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Crantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984) 等に従うことができる。

以上、a) 乃至 d) により得られる DNA の配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982) 等により行うことができる。

2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組み換え蛋白の製造方法

単離された本発明の新規蛋白をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクター DNA に再び組込むことにより、真核生物および原核生物の宿主細胞を形質

転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. Cell, 23, 175-182, 1981) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社製) 等がよく用いられるが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S., et al. Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社製) 等を例示できるが、これらに限定されない。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. and Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and

Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いた方法、および電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) や pSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P., J., Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより新規蛋白を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4 (Invitrogen 社製) などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞外に本発明の新規蛋白が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じ牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換細胞の細胞外に生産される本発明の新規蛋白は、該新規蛋白の物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によ

り、分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば該新規蛋白を含む培養液を通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

本発明の新規蛋白はマーカ配列とインフレームで融合して発現させることで、該新規蛋白の発現の確認、精製等が可能になる。マーカ配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカ配列と該新規蛋白の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンピンなどのプロテアーゼが認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。

3) 本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性を検出する方法

本発明の蛋白のアグリカナーゼ活性は、本発明の関節疾患アグリカナーゼと以下に挙げる基質とを適当な緩衝液中で混合し、反応させた後、それぞれの基質にあった方法で検出することができる。

基質としては、ヒトもしくは他の動物の軟骨・組織より精製したアグリカン、あるいは遺伝子組換えアグリカン、市販のアグリカン（生化学工業製）、もしくはそれらの部分蛋白を用いることができる。これらの基質と被試験プロテアーゼを含む細胞・組織培養液、細胞・組織抽出液もしくは（部分）精製標品を反応させ、Glu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断された断片を検出することによりアグリカナーゼ活性を測定することができる。Glu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断された断片の検出には、常法に従い分解断片のN末端配列もしくはC末端配列を決定する手法や、より簡便にGlu³⁷³-Ala³⁷⁴の間で切断されることにより生じるC末端のNITGE³⁷³、N末端の³⁷⁴ARGSVを特異的に認識する抗ネオエピトープ抗体

(Hughes C. E. et al., Biochem J., 305, 799-804, 1995) を用いた ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) やウエスタンブロッティング等の免疫学的手法を用いることができる。好ましくは、実施例 7 および 9 記載の方法で実施することができる。

4) 本発明の新規蛋白に反応する抗体の作製方法

本発明の新規蛋白に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、各種動物に該新規蛋白や該新規蛋白の断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明新規蛋白をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; Donnelly, J. J. et al., J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は該新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造されたポリクローナル抗体は常法の蛋白質単離精製法により、分離精製することができ、常法の蛋白質単離精製法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975) により当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明新規蛋白またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8. U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル最小必須培地、ダルベッコ修飾最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10～30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA 法、免疫組織染色法などの周知の方法または前記のスクリーニング法により行い、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクローニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で数日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10～20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水から常法の蛋白質単離精製法により分離精製することができる。

以上のように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法の蛋白質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、Fv を得ることができる。

さらには、本発明新規蛋白に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方法 (Clackson, T. et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Zebedee, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al., Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。

5) 本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を阻害する物質のスクリーニング方法

3) に示したアグリカナーゼ活性の検出法と同様の方法でスクリーニングが可能である。また、本発明の新規蛋白と反応させることにより分解され消滅・減少する添加したアグリカン、組換えアグリカン、市販のアグリカン、もしくはそれらの部分蛋白量を、アグリカナーゼで切断される部位の N 側および C 側部分のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて計測する実施例 10-2 に例示するような ELISA などの方法を用いることができる。さらには、本発明の新規蛋白と実施例 7-1 に例示するような N 末に FLAG タグ、C 末に His タグが付加した組換えアグリカンを反応させて分解され消滅・減少する添加した組換えアグリカン量を抗 FLAG タグ、抗 HIS タグ抗体を用いた ELISA 等で計測する方法が用いられる。この場合のタグは FLAG タグおよび His タグに限定されず、また、組換えアグリカンは実施例 7-1 に限定されず、本蛋白によりアグリカナーゼ切断部位で切断されるアグリカンの部分蛋白もしくは改変蛋白であればよい。アグリカナーゼ活性に用いる被験物質は、被験物質としては従来金属プロテアーゼ阻害活性を有することは知られているが該新規蛋白のアグリカナーゼ活性に対して阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用いる。

本発明の新規蛋白のアグリカナーゼ活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、本発明の新規蛋白またはその部分ペプチドの基質となるものであればいずれのものでも使用可能であり、好ましくは前記3）に記載の基質である。

6) プロテオグリカンの分解・遊離検出方法

軟骨プロテオグリカンの分解・遊離の検出、計測には、実施例 11-2 に例示される $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ をトレーサーとして用いる方法、プロテオグリカン抗体を用いる方法、ゲルろ過により分解断片を検出する方法（Methods in Cartilage Research, Academic Press Limited., 1990; Joint Cartilage Degradation, Marcel Dekker, Inc., 1993）や、1, 9-dimethylmethylen blue (DMMB) を用いた比色法（Goldberg R. L. and Kolibas L. M., Connect. Tissue Res., 24, 265-275, 1990）などが用いられるが、これらに限定されない。

7) 本発明のプロモーター活性を阻害する物質のスクリーニングの方法

本発明のプロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングする際、そのプロモーター活性を検出する方法としては、実施例 13 に示した配列（配列番号 24 乃至 31）およびその部分配列が有するレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常的手段（例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法）によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2（東洋インキ社製）や pSEAP2-Basic（Clontech 社製）などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定

することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に被験物質を添加することにより、被験物質の当該プロモーター活性に及ぼす作用を検出することができる。

本発明の配列番号の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）のスクリーニングには、上記のプロモーター活性を検出する方法と同様の方法を用いることができる。被験物質としては従来プロモーター活性を阻害することは知られているが配列番号 24 乃至 31 の配列およびその部分配列の有するプロモーター活性を阻害するかが不明な化合物またはペプチド、あるいは種々の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N. K. et al., Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) や通常の合成技術を用いて合成された化合物群やファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. et al., J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作製されたランダム・ペプチド群、抗体及び抗体断片を用いることができる。また、微生物の抽出物や培養上清、植物、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に構造修飾した化合物またはペプチドを用い得る。

本発明には、前記スクリーニング法により選択される「関節疾患アグリカナゼ」のアグリカナゼ活性を有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体及び抗体断片）を有効成分とする医薬が包含され、特に医薬として好ましくはプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物である。「関節疾患アグリカナゼ」の活性を有意に阻害する物質としては、実施例 10-2 で示されるスクリーニング系で選択された、 N^{α} -[2-(1-ヒドロキシカルバモイル-2-スルファニルエチル)-4-メチルペンタノイル]-N, O-ジメチルチロシンアミド（以下、化合物 A とする）、 N^{α} -[2-(1-ヒドロキシカルバモイル-2

ースルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーNーメチルフェニルアラニンアミド(以下、化合物Bとする)、 N^{α} ー[2ー(1ーヒドロキシカルバモイルー2ーフェニルスルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーN, Oージメチルチロシンアミド(以下、化合物Cとする)、 N^{α} ー[2ー(1ーヒドロキシカルバモイルー2ーメチルスルファニルエチル)ー4ーメチルペンタノイル]ーN, Oージメチルチロシンアミド(以下、化合物Dとする)などが挙げられる。上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは、W090/05719の請求の範囲に含まれる化合物であるが、本発明はそれらの化合物を有効成分とする医薬に限らず、「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質を有効成分とする医薬であれば全て包含される。尚、上記化合物A、化合物B、化合物C及び化合物DはW090/05719に収載された製造方法に準じてW090/05719に収載された化合物と同様に合成することができる。

本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のアグリカナーゼ活性を有意に阻害する物質(化合物、ペプチド、抗体または抗体断片)を有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注、関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、

溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～1000mg、好ましくは0.1～100mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では1日につき約0.01～1000mg、好ましくは0.01～100mgである。

図面の簡単な説明

図1は実施例6で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1の動物細胞株での発現結果を示す写真である。

図 2 は実施例 7-2 で得られた、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出結果を示す写真である。

図 3 は実施例 7-3 で得られた、ウェスタンブロッティング検出システムを用い、MDTS6TSP1 で分解された組換えアグリカン G1G2 の抗アグリカナゼネオエピトープ抗体による解析結果を示す写真である。

図 4 は実施例 8 で得られた、IL-1 β による MDTS6 mRNA の発現誘導を検討した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 5 は実施例 9-2 で得られた、MDTS6 蛋白による天然型アグリカンの分解をウェスタンブロッティング検出システムを用い、抗アグリカナゼネオエピトープ抗体で検出した結果を示す写真である。

図 6 は実施例 11-2 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞からの all-trans レチノイン酸および IL-1 β によるプロテオグリカンの遊離を検出した結果を示すグラフである。

図 7 は実施例 11-3 で得られた、ウサギ膝関節初代培養細胞を all-trans レチノイン酸および IL-1 β 処理した場合の MDTS6 の遺伝子発現変動を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動パターン写真である。

図 8 は実施例 12 で得られた、all-trans レチノイン酸によるウサギ膝関節初代培養細胞からのプロテオグリカンの分解・遊離が化合物 A および化合物 B により抑制されることを示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に説明する。

特に断りのない限り、公知の方法 (Sambrook, J. et al.; "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等

の遺伝子操作実験マニュアルに従ったが、本発明は実施例に限定されるものではない。

(実施例 1) 新規 ADAMTS 遺伝子 MDTs6 の部分配列の発見

ヒト脳由来 cDNA ライブラリーは文献 (Ohara O. et al., DNA Res., 4, 53-59, 1997) に示すように挿入配列の大きさによって厳密に分画されたものを構築した。これらのサブライブラリーの cDNA 断片のサイズ分布は 3kbp-8kbp である。このライブラリーを構成するクローンの 5'-及び 3'-末端の配列を解読し、自家製の EST データバンクを構築した。この中から、MDTs6 の部分配列を得た。

(実施例 2) MDTs6 の全長 ORF 配列の決定

MDTs6 の cDNA クローンの配列を決定することにより、配列番号 2 の 832 番から 2853 番の配列を得た。配列番号 2 の 1 番から 831 番の配列は、Clontech 社製のヒト脳およびヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を繰り返すことにより取得した。その結果、全長 MDTs6 は、配列番号 1 に示すように 950 アミノ酸からなる新規蛋白であることが判明した。そのドメイン構造は N 末から、分泌シグナル配列、プロ領域、furin プロテアーゼ認識配列、金属プロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン I 型繰り返し配列 (以下、TSP-I 繰り返し配列という)、Cys 残基に富むドメイン、中間領域、TSP-I 繰り返し配列 2 個であり、ADAMTS ファミリーに属する分子であった (Kuno, K. et al., J. Biol. Chem., 272, 556-562, 1997; Tang, B. L. et al., FEBS Lett., 445, 223-225, 1999)。

(実施例 3) C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

pCEP4 (Invitrogen 社製) を制限酵素 ClaI、NsiI で切断し、平滑末端化後、自己連結反応を行い、EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。このベクターを制限酵素 NheI、BamHI で切断し、アガロースゲル抽出した約 7.7kbp の断片に、配列番号 3 で示される核酸と配列番号 4 で示される核

-28-

酸をアニールさせた重鎖オリゴヌクレオチドを挿入して、目的の配列を有するクローンを選択し、pCEP4d-FLAG と命名した。このベクターを鋳型、配列番号 5 で示されるオリゴ DNA、配列番号 6 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用いて PCR 反応を行った。生じた約 0.4kbp の DNA 断片を制限酵素 SpeI で切断し、XbaI で切断した pCEP4d-FLAG (約 7.7kbp) に挿入し、目的通りプロモーターよりクローニングサイトの XbaI、NheI、NotI、BamHI 認識配列そして FLAG タグという順になっているクローンを選択して、pCEP4dE2-FLAG を完成した。

(実施例 4) MDTs6 短長蛋白 (MDTs6TSP1) 発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 583 番 (MDTs6 の N 末から TSP1 繰り返し配列を含む領域 (以下 MDTs6TSP1 とする) に相当する部分) を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1 番から 1749 番の遺伝子を PCR により取得した。配列番号 7 と配列番号 8 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、LA-Taq™ (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 10 回行った。この反応液を 50 倍希釈した DNA 溶液を鋳型として、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを用い、94℃2 分の後、98℃10 秒、66℃30 秒、74℃4 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃10 分の条件で PCR を行った。こうして生成した 5' 側に XbaI 認識配列および Kozak 配列を、3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認した後、制限酵素 XbaI、NotI で切断し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTs6TSP1-FLAG を完成した。

(実施例 5) MDTs6 全長蛋白発現プラスミドの構築

配列番号 1 の 1 番から 950 番を C 末に FLAG を付加した蛋白として発現するためのプラスミドは以下の如く構築した。

まず、配列番号 2 の 1534 番から 2850 番の遺伝子を PCR により取得した。詳しくは、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマー、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、50℃15 秒、72℃2 分のサイクルを 20 回、続いて 72℃7 分の反応を行った。なお、EST クローンのプラスミド DNA を鋳型とする代わりに、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社製) を鋳型、配列番号 9 と配列番号 10 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃2 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 72℃7 分の反応条件で PCR を行うことにより、目的断片を生成することができた。こうして生成した 3' 側に NotI 認識配列が付加された目的断片を PCR-Blunt にサブクローンして配列を確認し、pCRB-MDTS6-3H とした。

配列番号 2 の 1566 番から 1571 番に BamHI 認識配列があることを利用し、pCEP-MDTS6TSP1-FLAG を制限酵素 XbaI、BamHI で切断して生じた約 1.6 kbp の DNA 断片と、pCRB-MDTS6-3H を BamHI、NotI で切断して生じた約 1.3 kbp の DNA 断片を連結し、pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して、pCEP-MDTS6F-FLAG を完成した。

(実施例 6) MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現

実施例 4 において pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim 社製) を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞 (invitrogen 社製) に導入した。プラスミド導入後、1-2 日間培養して得た培養上清中に目的蛋白が存在することを、C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体 (マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2; Sigma 社製) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、上記培養上清を SDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロックエース (大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、マウス抗

-30-

FLAG モノクローナル抗体 (M2 ; Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Zymed 社製もしくは TAGO 社製) を順次反応させた。または、ブロッキング後、ビオチン化 M2 抗体 (Sigma 社製) 、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Amasham 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて該蛋白の発現を確認した (図 1) 。発現された蛋白の分子量はアミノ酸配列から算出される値よりも約 23K 小さかった。上述の如く HEK293-EBNA 細胞にて発現させた MDTS6TSP1 の N 末端配列は、C 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、実施例 7-1 の方法でアフィニティ精製した後、PVDF 膜に転写し、Ponceau S 染色された MDTS6TSP1 の N 末端配列を ABI 社 494 型ペプチドシーケンサーで解析することにより決定した。その結果、配列番号 1 の 213 番目の Phe から始まっており、他の ADAMTS 分子同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 583 番) になることが示された。また、MDTS6 全長蛋白についても実施例 5 で得られた発現プラスミドを用い、上記 MDTS6TSP1 の蛋白発現と同様に取得し、MDTS6TSP1 と同様に、プロ領域と金属プロテアーゼドメインの間にある furin プロテアーゼ認識配列で切断され成熟蛋白 (配列番号 1 の 213 番から 950 番) になることを確認した。

(実施例 7) 動物細胞を宿主に発現した MDTS6TSP1 蛋白の酵素活性の検出

(実施例 7-1) 組換えアグリカン G1G2 の調製

報告されているヒトアグリカンの遺伝子配列 (Doege K, et al. Biochem Soc Trans., 18, 200-202, 1990) をもとに合成した配列番号 11 と配列番号 12 で示されるオリゴ DNA をプライマー、ヒト胎盤の Marathon-Ready™ cDNA を鋳型、PyroBest™ DNA ポリメラーゼを DNA ポリメラーゼとして、94℃1 分の後、98℃10 秒、68℃2 分のサイクルを 40 回、続いて 68℃7 分の反応を行った。生成した DNA 断片を制限酵素 BamHI で切断し、pCEP-SigFla の BamHI 部位に導入し、ヒト

-31-

アグリカンの球状ドメイン 1 (G1) -球状ドメイン 2 (G2) の N 末に FLAG タグ、C 末に His タグの付加した蛋白を発現するために用いる発現プラスミド pCEP-rAgg を作製した。pCEP-SigFla は pCEP4d の HindIII、XhoI 部位に配列番号 13 と配列番号 14 で示されるオリゴ DNA の二重鎖を導入したものであり、プロモーターの下流に、文献 (Guan X-M. et al., J. Biol. Chem. 267, 21995-21998, 1992) に示されたインフルエンザウィルスの hemagglutinin 由来の分泌シグナル配列と FLAG タグ配列、続いて、BamHI 認識配列を有する発現ベクターである。

pCEP-rAgg を HEK293-EBNA 細胞に導入し、3-7 日培養して目的蛋白を発現、生産した。培養液上清からの目的蛋白の精製は、N 末端に FLAG タグが付加していることを利用して、アフィニティ精製した。すなわち、培養上清をカラムに詰めた M2-agarose (Sigma 社製) にアプライし、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl (以下、TBS という) で洗浄した後、0.1M Gly-HCl (pH 3.0) で、溶出、分画し、直ちに 1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和した。

(実施例 7-2) MDT56TSP1 蛋白の組換えアグリカン G1G2 分解活性の検出

実施例 6 において、発現プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 32-36 時間培養を継続し、培養上清を回収した。この培養上清と上記で調製した組換えアグリカンを混合し、37℃で 1 夜反応させ、SDS-PAGE 後、実施例 6 に記載した方法で、PVDF 膜に転写、ブロッキング後、抗 Hisx6 ポリクローナル抗体 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology 社製)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (MBL 社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて組換えアグリカンを検出した。その結果、発現プラスミドのみを導入したコントロールではみられない組換えアグリカンの分解物が検出された (図 2)。

(実施例 7-3) 抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体による解析

アグリカナーゼはアグリカンの Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ の間を選択的に切断する金属プロテアーゼである。この切断により生じた C 側のネオエピトープを認識する抗体を常法に従い、配列番号 32 で示される合成ペプチドと KLH とのコンジュゲートをマウスに 5 回免疫を繰り返すことにより調製した。実施例 7-2 と同様に転写、ブロッキングした PVDF 膜とこの抗体を反応させ、続いて、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Tago 社製) と反応させた後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて検出した。その結果、MDTS6 により生じた組換えアグリカン G1G2 分解物が抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体と反応し、検出されたバンドの分子量は実施例 7-2 で検出された分解物の分子量と一致した (図 3)。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

(実施例 8) IL-1 による MDTS6 mRNA の発現誘導

マウス細胞株 ATDC5 はインスリン処理により軟骨様細胞へと分化することが知られている (Atsumi T. et al., Cell Differ. Dev. 30, 109-116, 1990)。I 型コラーゲンコート 6 ウエルプレート (旭テクノグラス社製) に ATDC5 細胞を 4×10^5 /well で蒔き、DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS 培地で 2 日間培養した後、インスリン (終濃度 30ng/ml)、50 μ g/ml L-アスコルビン酸含有 DMEM/HamF12(1:1)/5%FCS 培地に交換し 5 日培養を継続し、IL-1 β (終濃度 5ng/ml) を添加して 0、1、2、4、8 時間処理した。各処理群より ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を調製し、その 1 μ g を鋳型として、BcaBESTTM RNA PCR Kit (宝酒造社製) を用い RT-PCR を行った。逆転写反応は添付の指示書に従い、Oligo dT-Adaptor primer をプライマーとして行い、PCR は MDTS6 の 3' 非翻訳領域の配列を基に合成した配列番号 15 および配列番号 16 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃ 2 分の後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 40 回、続いて 72℃ 7 分の反応で行った。反応液を 1%アガロ

ースにて電気泳動し、生成した約 0.3kbp のバンドの濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 により一過性に発現誘導されることが判明した（図 4）。

（実施例 9）MDTS6 による天然型アグリカン分解

（実施例 9-1）各種短長 MDTS6 蛋白の発現と組換えアグリカン G1G2 分解活性
pCEP4dE2-FLAG を骨格として作製した発現プラスミドを FuGENE™6

Transfection Reagent（Boeringer Mannheim 社製）を用いて添付指示書に従い HEK293-EBNA 細胞（invitrogen 社製）に導入した。プラスミド導入後、1 夜培養後、PBS 緩衝液で洗い、無血清培地に交換し、さらに 2-3 日間培養した。この培養液を 9,000rpm、10 分で遠心分離し、上清を MDTS6 の酵素源とした。この際、実施例 4 および実施例 5 で示した発現プラスミド以外に、各種短長 MDTS6 蛋白の発現プラスミドとして、配列番号 1 の 1 番から 447 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Pro とする）、配列番号 1 の 1 番から 518 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Dis とする）、配列番号 1 の 1 番から 687 番のアミノ酸の C 末に配列番号 33 で示されるポリペプチドが付加した蛋白（以降、MDTS6Cys とする）の 3 つの蛋白の発現プラスミドをデザインした。すなわち、MDTS6Cys の発現プラスミドは、実施例 5 で構築した全長蛋白発現プラスミドを鋳型、配列番号 7 と配列番号 17 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。また、MDTS6Pro の発現プラスミド、及び、MDTS6Dis の発現プラスミドは、上記 MDTS6Cys で作製したプラスミドと同様に作製し、具体的には PyroBest DNA polymerase を用いた PCR にて増幅した遺伝子を制限酵素 XbaI、NotI で切断し pCEP4dE2-FLAG の XbaI、NotI 部位に挿入して構築した。但し、PCR のプライマーとしては、MDTS6Pro の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 34 で示され

るオリゴ DNA を用い、MDTS6Dis の場合は、配列番号 7 で示されるオリゴ DNA と配列番号 35 で示されるオリゴ DNA の組み合わせをそれぞれ用いた。

上述の各種 MDTS6 蛋白 (MDTS6Cys、MDTS6Pro、MDTS6Dis) の蛋白発現は、(実施例 6) に記載の MDTS6TSP1 及び MDTS6 全長蛋白の動物細胞株での発現と同様に発現させた。上述の各種 MDTS6 蛋白のアグリカナーゼ活性を実施例 7-3 の方法で検討した結果、MDTS6Cys を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されたが、MDTS6Pro、MDTS6Dis を発現した培養上清にはアグリカナーゼ活性が検出されなかった。なお、発現された主要な蛋白の分子量はアミノ酸配列から計算される値よりも約 23K 小さく、実施例 6 で示された MDTS6TSP1 と同じく、furin プロテアーゼ認識配列でプロ領域が切断・除去された成熟蛋白であった。この結果、N 末から数えて 1 個目の TSP-1 繰り返し配列が MDTS6 のアグリカナーゼ活性の発揮に必須であることが判明した。

(実施例 9-2) 天然型アグリカンの分解

実施例 9-1 で調製した MDTS6 酵素液 90 μ l と天然型アグリカン (生化学工業社製) 10 μ g/10 μ l TBS を試験チューブ内で混合し、37℃で一夜反応させた。この反応産物を SpeedVac にて乾燥した後、Chondroitinase ABC 0.06 単位 (生化学工業社製)、keratanase I 0.024 単位 (生化学工業社製)、keratanase II 0.0004 単位 (生化学工業社製)、5 μ M PMSF、10mM EDTA を含む 10mM Tris-Acetate 緩衝液 (pH7.6) 100 μ l に溶解し、37℃で一夜反応させた。この反応液の一部を SDS-PAGE 後、実施例 7-3 に示す通りにマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体で検出した。この際、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクロナル抗体は Biosource 社製を用いた。アグリカナーゼネオエピトープを認識する BC-3 抗体 (Hughes C. E. et al, Biochemical J. 305, 799-804, 1995) でも同じ結果が得られた。

その結果、MDTS6Cys では約 150KDa のバンドに加え、80-90KDa のバンドが検出された。この切断パターンはヒトの OA、RA を含む関節疾患患者の関節滑

液中に認められる主要な分子（いずれもアグリカナーゼ分解で生じた）のパターン（Sandy J. D. et al, J. Clin. Invest., 89, 1512-1516, 1992; Lohmander L. S. et al., Arthritis Rheum. 36, 1214-1222, 1993）に一致し、また、ヒト膝関節軟骨の器官培養系において IL-1、レチノイン酸処理 12-24 時間で生じる主要なアグリカナーゼネオエピトープを有する分子のパターン（Little C. B. et al., Biochemical J., 344, 61-68, 1999）に一致した（図 5）。

（実施例 10）アグリカナーゼ活性を修飾する物質のスクリーニング系

（実施例 10-1）MDTS6Cys および基質の調製

MDTS6Cys は精製せずとも実施例 9-1 の方法で調整した培養上清で上記組換えアグリカン GIG2 および天然型アグリカン Glu³⁷³-Ala³⁷⁴（以下、"aggrecanase site"）の間を切断することを、実施例 9-2 に示したウエスタンブローディングを用いた方法で確認した。また、実施例 9-1 で無血清培地に置換せず、10%FBS 含有培地で培養を継続した培養上清を用いても、"aggrecanase site"での切断が認められた。そのため、基質としては実施例 7-1 で調製した組換えアグリカン GIG2 を用いた。

（実施例 10-2）スクリーニング系

組換えアグリカンおよび天然型アグリカンを基質に実施例 7-2 に示したウエスタンブローディングを用いた方法でスクリーニング可能であるが、より大量の被験化合物をスクリーニングするために下記の ELISA 系を構築した。

MDTS6Cys 培養上清、組換えアグリカン GIG2、被験化合物を混合し、37℃にて数時間反応させた産物を 96 穴プレート（Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface #439454 ; Nunc 社製）に吸着させ、1%BSA/TBS 溶液でブロッキングした後、マウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いて HRP コンジュゲート抗マウス IgG 抗体（Biosource 社製）を反応させ、添付説明書の条件にしたがい TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad 社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。また、その変法

として、組換えアグリカンを予め96穴プレート（Nunc社製）に吸着させ、1%BSA/TBS溶液でブロッキングした後、MDTS6Cys培養上清と被験化合物を添加し、37℃にて数時間反応させた後、同様にマウス抗アグリカナーゼネオエピトープ抗体、続いてHRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体（Biosource社製）を反応させ、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit（Bio-Rad社製）で検出し、発色阻害を指標に被験化合物のアグリカナーゼ活性阻害強度を算出した。アグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度（ IC_{50} ）において、好ましくは10 μ M以下、さらに好ましくは1.0 μ M以下である。

本スクリーニング系により、先に記載した化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dが選択することができた。アグリカナーゼ活性阻害強度（ IC_{50} ）は、化合物Aでは0.6 μ M、化合物Bでは1.0 μ M、化合物Cでは2.9 μ M、化合物Dでは2.7 μ Mを示した。

なお、化合物A、化合物B、化合物C及び化合物Dは先に示したPCT公開番号W090/05719に記載された製造法と同様に合成された。それぞれの化合物のマススペクトルは以下の通りである。化合物Aは $MS = 426$ (MH^+)、化合物Bは $MS = 396$ (MH^+)、化合物Cは $MS = 502$ (MH^+)、化合物Dは $MS = 440$ (MH^+)。

（実施例 11）

（実施例 11-1）ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞の調製

ウサギ（日本白色種、オス、1.0～1.5kg）を過剰麻酔下で致死させた後、膝関節を摘出し、関節表面の軟骨層をメスにて剥離、細断した。さらに、トリプシン-EDTA（0.25%-1mM；GIBCO-BRL社製）にて37℃、1時間処理の後、1500rpm、5分の遠心分離し沈殿をDMEMで洗浄した。続いてコラゲナーゼA（0.15%；ベリンガー・マンハイム社製）/DMEMにて37℃、3～4時間処理した後、ナイロン

メッシュフィルター (100 μ m, Falcon 社製) 通過画分を 1500rpm、5 分の遠心分離にかけ、軟骨細胞を沈殿させた。DMEM/10%FBS 培地で十分に洗浄した後、DMEM/10%FBS 培地に 2×10^5 cells/ml になるように懸濁し、I 型コラーゲンをコートした 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) に 200 μ l/穴で蒔いた。3 日後に培地を 50 μ g/ml アスコルビン酸含有 DMEM/10%FBS 培地 (以下、アスコルビン酸培地) 200 μ l に交換し、さらに 3 日間培養した。I 型コラーゲンをコートした 6 穴プレート (旭テクノグラス) を用いる場合は、上記細胞懸濁液を 6ml/穴で蒔き、同様に培地交換を行い培養した。これらの細胞を以下の実験に供した。

(実施例 11-2) ウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解

実施例 11-1 で示した 96 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞を終濃度 10 μ Ci/ml の $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 含有アスコルビン酸培地 200 μ l にて 2 日間培養、標識した後、200 μ l のアスコルビン酸培地で 3 回洗浄し、200 μ l のアスコルビン酸培地で 1 日間培養した。IL-1 β および all-trans レチノイン酸で刺激し、0 時間後、24 時間後、48 時間後の培養上清を 20 μ l ずつ回収し、トップカウンタ (Packard 社製) を用い、放射活性を計測した。その結果、0.01~10ng/ml の IL-1 β で放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められ、0.1~10 μ M の all-trans レチノイン酸で濃度依存的かつ強い放射活性の上昇、すなわちプロテオグリカンの遊離が認められた (図 6)。

(実施例 11-3) MDS6 mRNA の発現誘導

実施例 11-1 で示した 6 穴プレートのウサギ膝関節軟骨初代培養細胞をアスコルビン培地に交換しさらに 3 日間培養した後、10ng/ml の IL-1 β もしくは 10 μ M の all-trans レチノイン酸を添加し、2 時間後および 6 時間後の total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて添付の指示書に従い調製した。さらに、DNase I 処理 (ニッポンジーン社製) を行い、フェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿にて回収・精製した total RNA を DEPC 処理した滅菌水に溶解した。ランダムヘキサマーをプライマーとして、この total RNA 1 μ g を

Thermoscript™ RT-PCR System (GIBCO-BRL 社製カタログ番号 11146-016) を用い、添付の指示書に従い逆転写反応、RNase H 処理を行ったものを滅菌水で 10 倍希釈し、cDNA サンプルとした。この cDNA サンプル各 5 μ l を鋳型、配列番号 18 および配列番号 19 で示されるオリゴ DNA をプライマーとして、94℃ 2 分の後、94℃ 30 秒、65℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 45 回、続いて 72℃ 7 分の PCR 反応を行った。反応産物を 2% アガロースにて電気泳動し、生成した DNA 断片の濃さを比較した。その結果、MDTS6 mRNA は IL-1 β および all-trans レチノイン酸により発現誘導し、その発現強度は実施例 11-2 におけるプロテオグリカン分解の程度と相関した (図 7)。

(実施例 12) アグリカナーゼ活性を阻害する物質によるウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解抑制

実施例 10-2 のスクリーニング系により選択された化合物 A、化合物 B、化合物 C 及び化合物 D を実施例 11-1 で示したウサギ膝関節軟骨初代培養細胞のプロテオグリカン分解系に 10 μ M の all-trans レチノイン酸刺激直前に添加し、その抑制作用を検討した。その結果、化合物 A 及び化合物 B は濃度依存的に抑制作用を示した (図 8)。化合物 C 及び化合物 D のプロテオグリカン分解抑制作用 (IC_{50}) は、化合物 C は 6.3 μ M、化合物 D は 4.1 μ M となった。一方、同じヒドロキサム酸骨格を持つがアグリカナーゼ活性阻害が弱い化合物では 100 μ M でもプロテオグリカンの分解抑制作用は認められなかった。

(実施例 13) MDTS6 プロモーター領域 DNA 配列の解析

MDTS6 のプロモーター領域に相当する DNA は GenomeWalker DNA Sca I Libraries (genome walker™ Kits, CLONTECH 社カタログ番号 K1803-1) より、PCR 法を用いて増幅した。forward primer としてキット添付のアダプタープライマー AP-1 (配列番号 20)、AP-2 (配列番号 21) のオリゴ DNA を、reverse primer として配列番号 22、配列番号 23 のオリゴ DNA を用いた。具体的な方法はキットの添付説明書通りであるが、PCR には TAKARA LA Taq (TAKARA LA Taq™、カタ

ログ番号 RR002A)を用いた。1回目の PCR 反応はプライマーとして配列番号 20 と配列番号 22 のオリゴ DNA を用い、98℃5 秒、72℃3 分のサイクルを 7 回、98℃5 秒、67℃3 分のサイクルを 32 回、67℃4 分であった。2 回目の反応は 1 回目の反応溶液を TE 緩衝液 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いて 50 倍希釈したもの 5 μ l を鋳型、配列番号 21 と配列番号 23 のオリゴ DNA をプライマーとして、上記と同じ条件で行った。増幅された約 3.7 kbp の DNA 断片を直接 dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc) にて配列解析した結果、解読できない 2 ヶ所のギャップで分断された約 2.2 kbp, 0.36 kbp, 0.8 kbp の DNA 配列が明らかになった。

次に、PCR 増幅 DNA 断片の直接解析で解読できなかった 2 カ所のギャップ部の配列を判読するために、この DNA 断片をサブクローニングして、DNA の塩基配列の決定を行った。その結果、該ギャップ部の配列は決定した 8 クローン (配列番号 24、25、26、27、28、29、30 及び 31) で異なり、遺伝子多型の存在が示唆された。なお、クローニングベクターとしては pZErO™-2 vector (Zero Background/ Kan Cloning Kit, Invitrogen 社製、カタログ番号 K2600-01) を用いて、サブクローニングの操作は添付の説明書に従った。

上記 DNA 断片をレポータープラスミド pGV-B2 (東洋インキ社製) の KpnI, XhoI 部位に挿入したプラスミドを FuGene-6 を用い HEK293 細胞に導入し、通常の培養条件で 28 時間または 48 時間培養後のルシフェラーゼ活性を、PicaGene 発色キット (東洋インキ社製、カタログ番号 PGK-L100) を用いて測定した。この際、測定値は同時導入した β -gal 発現プラスミド pCH110 (アマシャムファルマシア バイオテック社製、カタログ番号 27-4508-01) より発現した β -gal の活性値で補正した。 β -gal 活性の測定は Galacto-Light Plus キット (TROPIX 社製、カタログ番号 BL300P) を用いた。その結果、もとのプラスミドである pGV-B2 では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記 DNA 断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

(実施例 14) 変形性関節症患者の関節組織での MDS6 発現

変形性関節症患者の疾患部の膝関節軟骨より total RNA を調製し (Adams M. E., et al., Anal. Biochem., 202, 89-95, 1992)、これを鋳型として実施例 11-3 に準じて RT-PCR を行うことにより、MDS6 mRNA の存在を確認した。また、マウス抗ヒト MDS6 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行い、滑膜組織およびマクロファージに MDS6 蛋白の存在を確認した。

なお、マウス抗ヒト MDS6 特異的ポリクローナル抗体は以下の如く調製した。まず、実施例 6 で調製したヒト MDS6TSP1 蛋白を KLH とコンジュゲートし、マウスに 4-5 回免疫した後、抗血清を調製した。続いて、この抗血清より、Protein G Sepharase 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) を用い、添付指示書に従い、IgG を調製した。さらに、添付指示書に従い、ヒト MDS6TSP1 蛋白を CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow (Amasham Pharmacia Biotech 社製) に固定したカラムを作製した。このカラムに結合し、対応するヒト ADAMTS4TSP1 蛋白 (aggrecanase-1; Tortorella M. D. et al., Science., 284, 1664-1666, 1999)、METH-1TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999)、METH-2TSP1 蛋白 (Vazquez F. et al., J. Biol. Chem., 274, 23349-57, 1999) を固定したカラムに結合しない分画を調製した。

産業上の利用可能性

本発明で得られた「関節疾患アグリカナーゼ」は、アグリカナーゼ活性を有することより、該アグリカナーゼを有意に阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）のスクリーニングに用いられることを特徴としている。ここで、該「関節疾患アグリカナーゼ」を有意に阻害する物質の医薬用途としては該アグリカナーゼ活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患であ

る関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。

さらに、本発明の「関節疾患アグリカナーゼ」のプロモーター遺伝子は、該遺伝子のプロモーター活性を阻害する物質（化合物、ペプチド、抗体又は抗体断片）をスクリーニングに用いられることを特徴とする。該プロモーター活性を阻害する物質の用途としては、プロモーター活性の阻害に起因する疾患の内、特にプロテオグリカン分解亢進を示す疾患である関節疾患、なかでも変形性関節症の予防・治療に有効であることが示唆される。また、該プロモーター遺伝子には複数の変異体が存在することより、上記疾患との相関解析に用いられる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
2. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
3. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 687 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 1 番から第 583 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 950 番のアミノ酸配列、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 687 番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の第 213 番から第 583 番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物。
4. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物のアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲 4 に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. 請求の範囲 6 に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物の製造方法。
8. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物に対する抗体。
9. 請求の範囲 1 乃至 3 の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プ

-43-

ロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物と被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ、又は、該金属プロテアーゼの同効物を阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、又は該遺伝子の同効物。

補正書の請求の範囲

[2001年4月19日(19.04.01)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲1-4及び7-11は補正された；他の請求の範囲は変更なし。(2頁)]

1. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
2. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列を含むアグリカナーゼ活性を有する、或いは、第1番から第583番のアミノ酸配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
3. (補正後) 配列番号1で表されるアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第687番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第1番から第583番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第950番のアミノ酸配列、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第687番のアミノ酸配列、若しくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第213番から第583番のアミノ酸配列を有するアグリカナーゼ活性を有する、或いは、それぞれの配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、アミノ酸残基が置換、欠失、及び／または挿入されていて、かつ、アグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼ。
4. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。
5. 請求の範囲4に記載の遺伝子を含むベクター。
6. 請求の範囲5に記載のベクターを含む宿主細胞。
7. (補正後) 請求の範囲6に記載の宿主細胞を用いることを特徴とする、請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼの製造方法。
8. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼに対する抗体。
9. (補正後) 請求の範囲1乃至3の何れかに記載のアグリカナーゼ活性を有する金

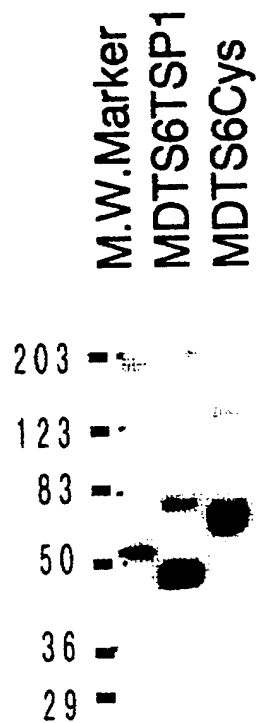
属プロテアーゼと被験化合物とを接触させることを特徴とする、当該金属プロテアーゼのアグリカナーゼ活性を阻害する物質をスクリーニングする方法。

10. (補正後) 請求の範囲1乃至3に記載のアグリカナーゼ活性を有する金属プロテアーゼを阻害する物質を有効成分とするプロテオグリカン分解抑制用医薬組成物。

11. (補正後) 配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31で表される遺伝子、或いは、配列番号24、25、26、27、28、29、30若しくは31に記載の塩基配列の中のいずれかの1乃至10個の部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されていて、かつ、関節疾患アグリカナーゼプロモーター活性を有する遺伝子。

1/8

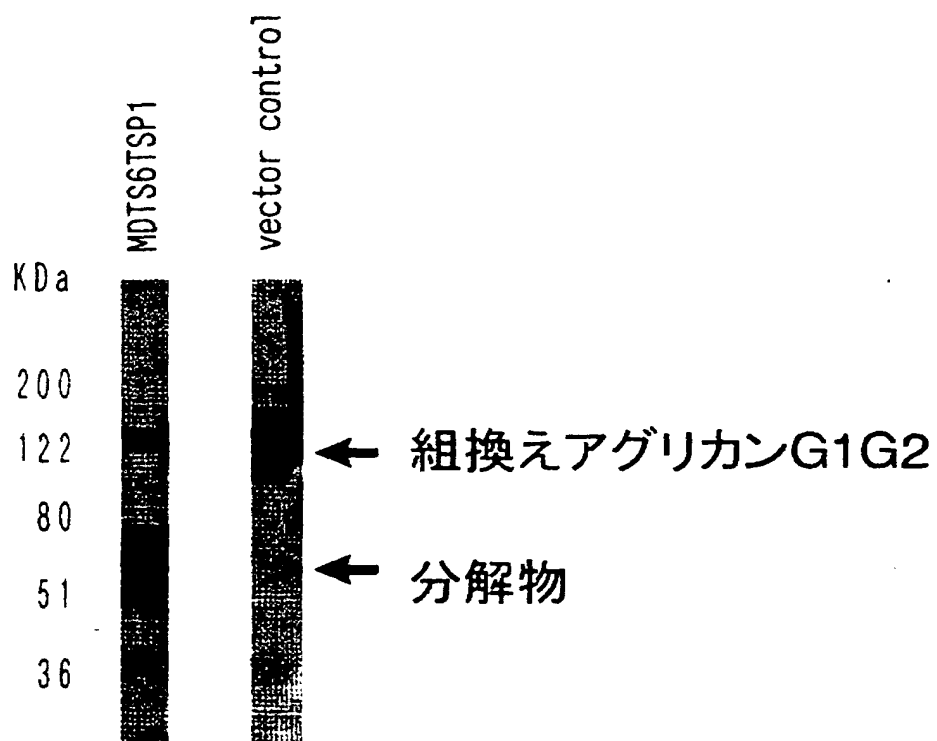
図 1



差 替 え 用 紙 (規則26)

2/8

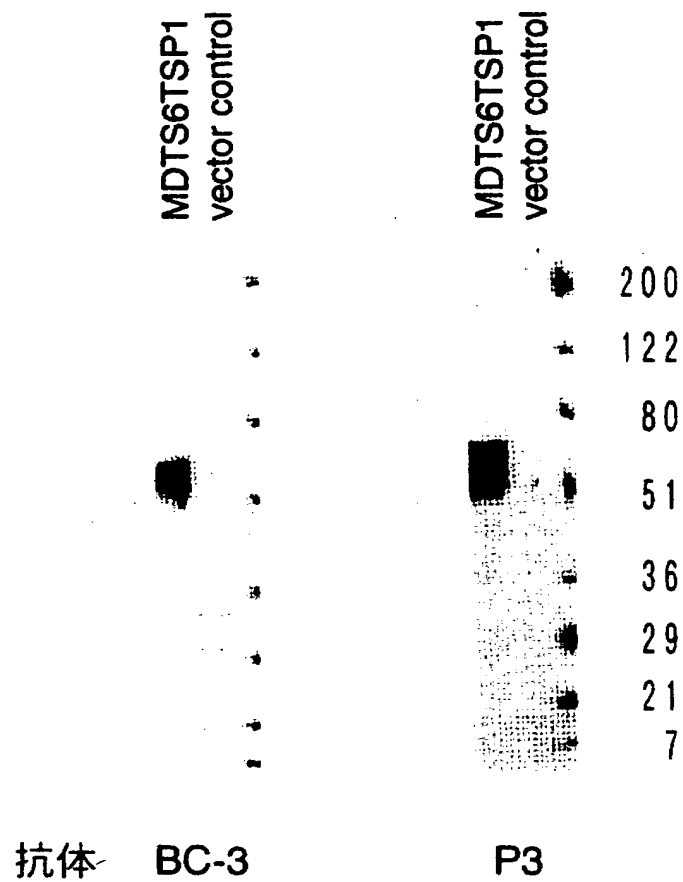
図 2



差替え用紙 (規則26)

3/8

図 3

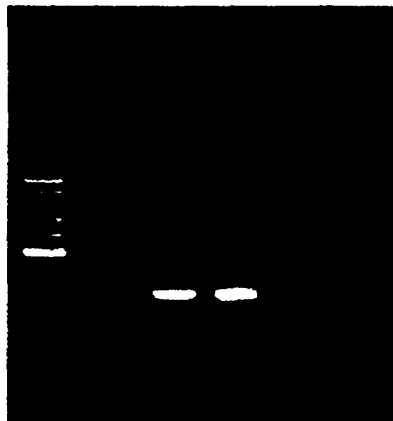


差替え用紙 (規則26)

4/8

図 4

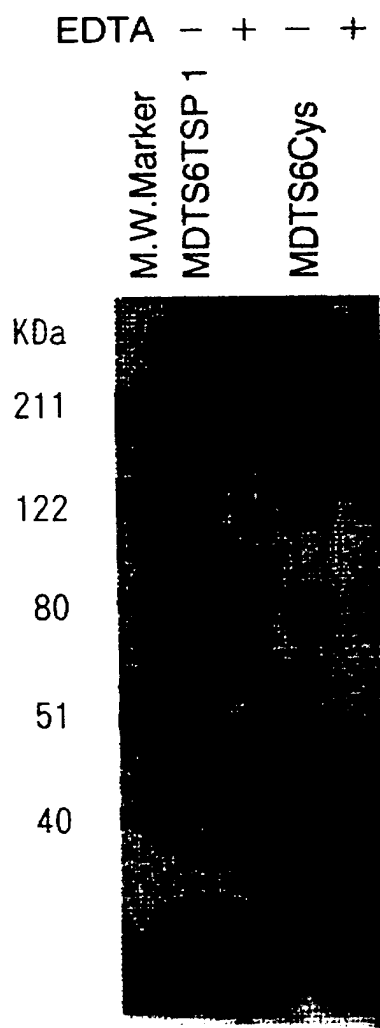
IL-1 処理 (時間) 0 1 2 4 8



置き換え用紙 (規則56)

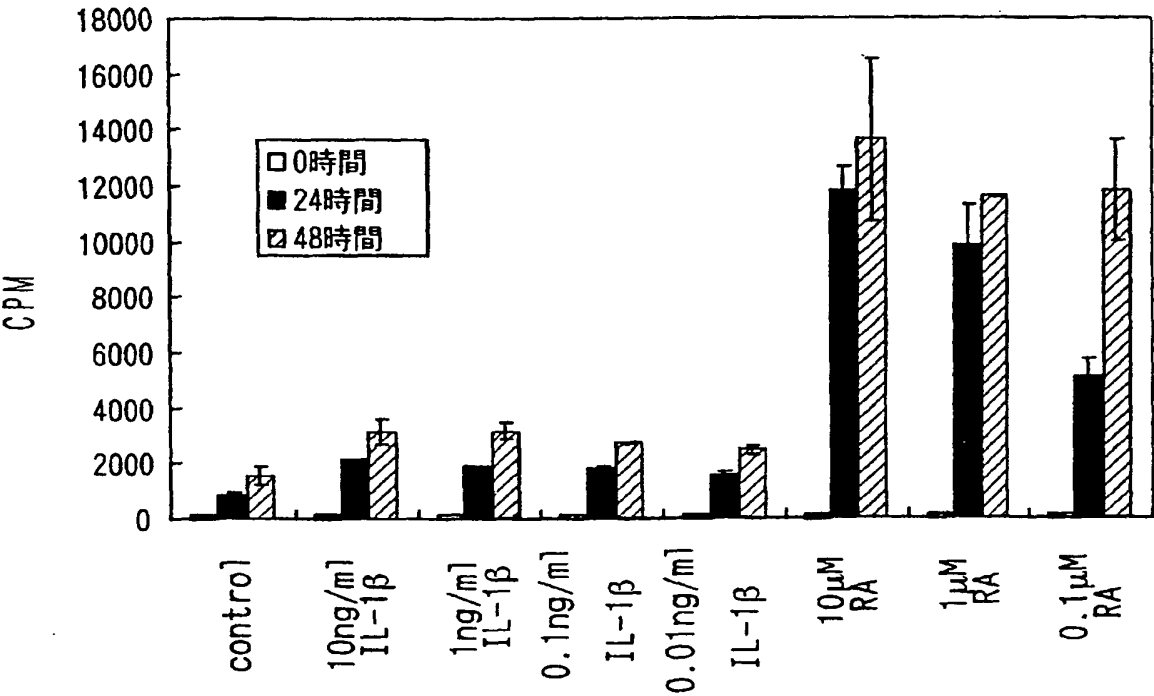
5/8

☒ 5



差 替 え 用 紙 (規則26)

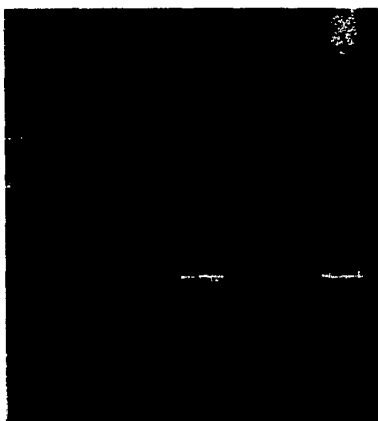
図 6



7/8

図 7

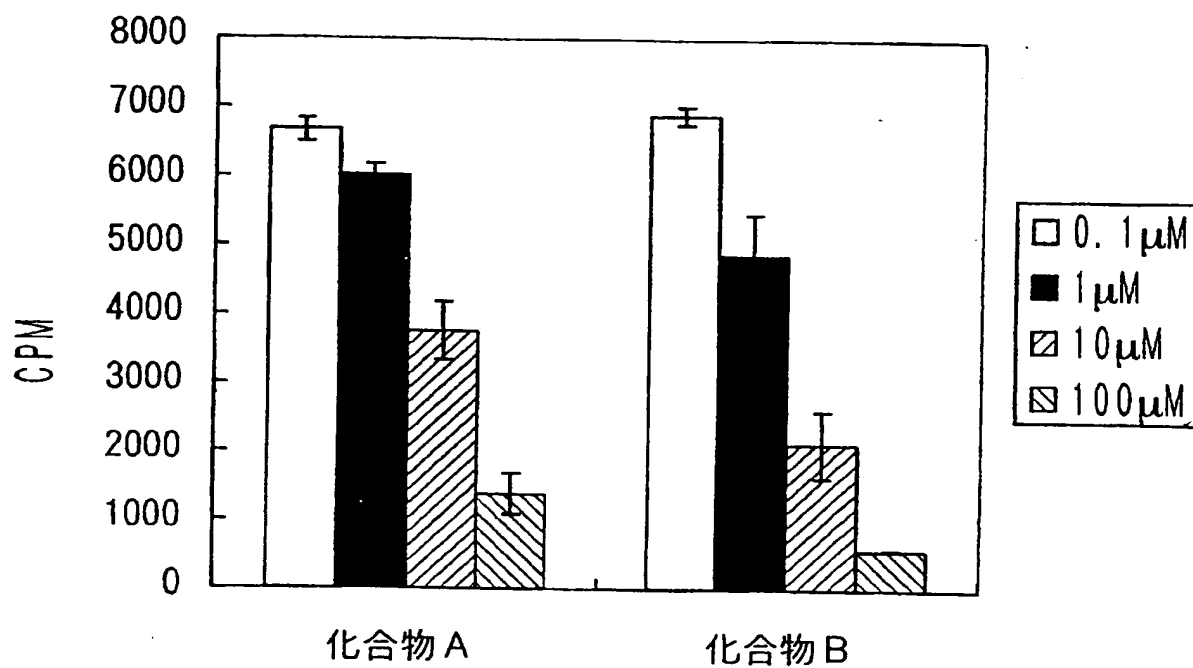
1 2 3 4 5



1: 非処理
2: IL-1 β 2時間処理
3: R.A. 2時間処理
4: IL-1 β 6時間処理
5: R.A. 6時間処理

差替え用紙 (規則26)

図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Kazusa DNA Research Institute

Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel metalloprotease having an activity of aggrecanase

<130> YK0029

<140>

<141>

<150>JP 1999-321740

<151>1999-11-11

<150>JP 2000-144020

<151>2000-5-16

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ile Leu Thr Leu Ala Phe Ala Gly Arg Thr Ala

1

5

10

15

Gly Gly Phe Glu Pro Glu Arg Glu Val Val Val Pro Ile Arg Leu Asp

20

25

30

Pro Asp Ile Asn Gly Arg Arg Tyr Tyr Trp Arg Gly Pro Glu Asp Ser

35

40

45

Gly Asp Gln Gly Leu Ile Phe Gln Ile Thr Ala Phe Gln Glu Asp Phe

50

55

60

2/27

Tyr Leu His Leu Thr Pro Asp Ala Gln Phe Leu Ala Pro Ala Phe Ser
 65 70 75 80
 Thr Glu His Leu Gly Val Pro Leu Gln Gly Leu Thr Gly Gly Ser Ser
 85 90 95
 Asp Leu Arg Arg Cys Phe Tyr Ser Gly Asp Val Asn Ala Glu Pro Asp
 100 105 110
 Ser Phe Ala Ala Val Ser Leu Cys Gly Gly Leu Arg Gly Ala Phe Gly
 115 120 125
 Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ile Ser Pro Leu Pro Asn Ala Ser Ala
 130 135 140
 Pro Ala Ala Gln Arg Asn Ser Gln Gly Ala His Leu Leu Gln Arg Arg
 145 150 155 160
 Gly Val Pro Gly Gly Pro Ser Gly Asp Pro Thr Ser Arg Cys Gly Val
 165 170 175
 Ala Ser Gly Trp Asn Pro Ala Ile Leu Arg Ala Leu Asp Pro Tyr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Arg Ala Gly Phe Gly Glu Ser Arg Ser Arg Arg Arg Ser Gly
 195 200 205
 Arg Ala Lys Arg Phe Val Ser Ile Pro Arg Tyr Val Glu Thr Leu Val
 210 215 220
 Val Ala Asp Glu Ser Met Val Lys Phe His Gly Ala Asp Leu Glu His
 225 230 235 240
 Tyr Leu Leu Thr Leu Leu Ala Thr Ala Ala Arg Leu Tyr Arg His Pro
 245 250 255
 Ser Ile Leu Asn Pro Ile Asn Ile Val Val Val Lys Val Leu Leu Leu
 260 265 270
 Arg Asp Arg Asp Ser Gly Pro Lys Val Thr Gly Asn Ala Ala Leu Thr
 275 280 285
 Leu Arg Asn Phe Cys Ala Trp Gln Lys Lys Leu Asn Lys Val Ser Asp
 290 295 300
 Lys His Pro Glu Tyr Trp Asp Thr Ala Ile Leu Phe Thr Arg Gln Asp
 305 310 315 320
 Leu Cys Gly Ala Thr Thr Cys Asp Thr Leu Gly Met Ala Asp Val Gly
 325 330 335
 Thr Met Cys Asp Pro Lys Arg Ser Cys Ser Val Ile Glu Asp Asp Gly
 340 345 350

3/27

Leu Pro Ser Ala Phe Thr Thr Ala His Glu Leu Gly His Val Phe Asn
 355 360 365
 Met Pro His Asp Asn Val Lys Val Cys Glu Glu Val Phe Gly Lys Leu
 370 375 380
 Arg Ala Asn His Met Met Ser Pro Thr Leu Ile Gln Ile Asp Arg Ala
 385 390 395 400
 Asn Pro Trp Ser Ala Cys Ser Ala Ala Ile Ile Thr Asp Phe Leu Asp
 405 410 415
 Ser Gly His Gly Asp Cys Leu Leu Asp Gln Pro Ser Lys Pro Ile Ser
 420 425 430
 Leu Pro Glu Asp Leu Pro Gly Ala Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Gln Cys
 435 440 445
 Glu Leu Ala Phe Gly Val Gly Ser Lys Pro Cys Pro Tyr Met Gln Tyr
 450 455 460
 Cys Thr Lys Leu Trp Cys Thr Gly Lys Ala Lys Gly Gln Met Val Cys
 465 470 475 480
 Gln Thr Arg His Phe Pro Trp Ala Asp Gly Thr Ser Cys Gly Glu Gly
 485 490 495
 Lys Leu Cys Leu Lys Gly Ala Cys Val Glu Arg His Asn Leu Asn Lys
 500 505 510
 His Arg Val Asp Gly Ser Trp Ala Lys Trp Asp Pro Tyr Gly Pro Cys
 515 520 525
 Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Gln Leu Ala Arg Arg Gln Cys Thr
 530 535 540
 Asn Pro Thr Pro Ala Asn Gly Gly Lys Tyr Cys Glu Gly Val Arg Val
 545 550 555 560
 Lys Tyr Arg Ser Cys Asn Leu Glu Pro Cys Pro Ser Ser Ala Ser Gly
 565 570 575
 Lys Ser Phe Arg Glu Glu Gln Cys Glu Ala Phe Asn Gly Tyr Asn His
 580 585 590
 Ser Thr Asn Arg Leu Thr Leu Ala Val Ala Trp Val Pro Lys Tyr Ser
 595 600 605
 Gly Val Ser Pro Arg Asp Lys Cys Lys Leu Ile Cys Arg Ala Asn Gly
 610 615 620
 Thr Gly Tyr Phe Tyr Val Leu Ala Pro Lys Val Val Asp Gly Thr Leu
 625 630 635 640

4/27

Cys Ser Pro Asp Ser Thr Ser Val Cys Val Gln Gly Lys Cys Ile Lys			
	645	650	655
Ala Gly Cys Asp Gly Asn Leu Gly Ser Lys Lys Arg Phe Asp Lys Cys			
	660	665	670
Gly Val Cys Gly Gly Asp Asn Lys Ser Cys Lys Lys Val Thr Gly Leu			
	675	680	685
Phe Thr Lys Pro Met His Gly Tyr Asn Phe Val Val Ala Ile Pro Ala			
	690	695	700
Gly Ala Ser Ser Ile Asp Ile Arg Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Leu Ile			
	705	710	715
Gly Asp Asp Asn Tyr Leu Ala Leu Lys Asn Ser Gln Gly Lys Tyr Leu			
	725	730	735
Leu Asn Gly His Phe Val Val Ser Ala Val Glu Arg Asp Leu Val Val			
	740	745	750
Lys Gly Ser Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Thr Ala Val Glu Ser			
	755	760	765
Leu Gln Ala Ser Arg Pro Ile Leu Glu Pro Leu Thr Val Glu Val Leu			
	770	775	780
Ser Val Gly Lys Met Thr Pro Pro Arg Val Arg Tyr Ser Phe Tyr Leu			
	785	790	795
Pro Lys Glu Pro Arg Glu Asp Lys Ser Ser His Pro Lys Asp Pro Arg			
	805	810	815
Gly Pro Ser Val Leu His Asn Ser Val Leu Ser Leu Ser Asn Gln Val			
	820	825	830
Glu Gln Pro Asp Asp Arg Pro Pro Ala Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp			
	835	840	845
Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Ser Gly Leu Gln Lys Arg Ala Val			
	850	855	860
Asp Cys Arg Gly Ser Ala Gly Gln Arg Thr Val Pro Ala Cys Asp Ala			
	865	870	875
Ala His Arg Pro Val Glu Thr Gln Ala Cys Gly Glu Pro Cys Pro Thr			
	885	890	895
Trp Glu Leu Ser Ala Trp Ser Pro Cys Ser Lys Ser Cys Gly Arg Gly			
	900	905	910
Phe Gln Arg Arg Ser Leu Lys Cys Val Gly His Gly Gly Arg Leu Leu			
	915	920	925

Ala Arg Asp Gln Cys Asn Leu His Arg Lys Pro Gln Glu Leu Asp Phe

930

935

940

Cys Val Leu Arg Pro Cys

945

950

<210> 2

<211> 2853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgctttttgc tgggcatcct aaccctggct ttgcgcgggc gaaccgctgg aggctttgag 60
ccagagcggg aggtagtcgt tcccatccga ctggaccggg acattaacgg ccgccgctac 120
tactggcggg gtcccaggga ctccggggat cagggaactca tttttcagat cacagcattt 180
caggaggact ttacctaca cctgacgccg gatgctcagt tcttggctcc cgccttctcc 240
actgagcatt tgggcgtccc cctccagggg ctccaccggg gctcttcaga cctgcgacgc 300
tgcttctatt ctggggacgt gaacgccgag cgggactcgt tcgctgctgt gagcctgtgc 360
ggggggctcc gcggagcctt tggctaccga ggccggaggt atgtcattag cccgctgccc 420
aatgctagcg cggcgccggc gcagcgcaac agccaggggc cacaccttct ccagcgccgg 480
gggtgttcgg gcgggacctt cggagacccc acctctcgtt gcgggggtgg ctcgggctgg 540
aaccgcgcca tcctacgggc cctggaccct tacaagccgc ggccggcggg cttcggggag 600
agtcgtagcc ggccgaggtc tgggcgcgcc aagcgtttcg tgtctatccc gcggtacgtg 660
gagacgctgg tggtcgcgga cgagtcaatg gtcaagttcc acggcgcgga cctggaacat 720
tatctgtcta cgctgtctgg aacggcggcg cgactctacc gccatcccag catcctcaac 780
cccatcaaca tcgttgttgt caagggtgtg ctcttagag atcgtgactc cgggcccagg 840
gtcaccggca atgcggccct gacgtctgcg aacttctgtg cctggcagaa gaagctgaac 900
aaagttagtg acaagcacc caggtactgg gacactgcca tcctcttcac caggcaggac 960
ctgtgtggag ccaccacctg tgacacctg gccatggctg atgtgggtac catgtgtgac 1020
cccaagagaa gctgctctgt cattgaggac gatgggcttc catcagcctt caccactgcc 1080
cacgagctgg gccacgtgtt caacatgccc catgacaatg tgaaagtctg tgaggagggtg 1140
tttggaagc tccgagccaa ccacatgatg tcccggacc tcattccagat cgaccgtgcc 1200
aacccttgt cagcctgcag tgcctgcatc atcaccgact tcctggacag cgggcacggt 1260
gactgcctcc tggaccaacc cagcaagccc atctccctgc ccgaggatct gccggcgccc 1320
agctacacc tgagccagca gtgcgagctg gcttttggcg tgggctccaa gccctgtcct 1380
tacatgcagt actgcaccaa gctgttgtgc accgggaagg ccaagggaca gatggtgtgc 1440

```

6/27

```

cagacccgcc acttcccctg ggccgatggc accagctgtg gcgagggcaa gctctgcctc 1500
aaaggggcct gcgtggagag acacaacctc aacaagcaca ggggtggatgg ttcctgggcc 1560
aaatgggata cctatggccc ctgctcgcgc acatgtgggtg ggggcgtgca gctggccagg 1620
aggcagtga ccaacccccac ccctgccaac gggggcaagt actgcgaggg agtgaggggtg 1680
aaataccgat cctgcaacct ggagccctgc ccagctcag cctccgaaa gagcttccgg 1740
gaggagcagt gtgaggcttt caacggctac aaccacagca ccaaccggct cactctcgcc 1800
gtggcatggg tgcccaagta ctccggcgtg tctccccggg acaagtgcaa gctcatctgc 1860
cgagccaatg gcactggcta ctctatgtg ctggcaccca aggtgggtgga cggcacgctg 1920
tgctctcctg actccacctc cgtctgtgtc caaggcaagt gcatcaaggc tggctgtgat 1980
gggaacctgg gctccaagaa gagattcgac aagtgtgggg tggtgtgggg agacaataag 2040
agctgcaaga aggtgactgg actcttcacc aagcccatgc atggctacaa ttctgtgtg 2100
gccatccccg caggcgccctc aagcatcgac atccgccagc gcggttacia agggctgata 2160
gggatgaca actacctggc tctgaagaac agccaaggca agtacctgct caacgggcat 2220
ttctgtgtgt cggcgggtgga gcgggacctg gtggtgaagg gcagctctgt gcggtacagc 2280
ggcacgggca cagcgggtgga gagcctgcag gcttccccgc ccatcctgga gccgctgacc 2340
gtggagggtc tctccgtggg gaagatgaca ccgccccggg tccgtactc ctctatctg 2400
cccaaagagc ctggggagga caagtcctct catcccaagg acccccgggg accctctgtc 2460
ttgcacaaca gcgtccctcag cctctccaac cagggtggagc agccggacga caggccccct 2520
gcacgctggg tggctggcag ctggggggccg tgctccgga gctgcggcag tggcctgcag 2580
aagcggggcg tggactgccg gggctccgcc gggcagcgca cggctccctgc ctgtgatgca 2640
gccccatcgg ccgtggagac acaagcctgc ggggagccct gccccacctg ggagctcagc 2700
gcctggtcac cctgctccaa gagctgcggc cggggatttc agaggcgctc actcaagtgt 2760
gtggggccag gaggccggct gctggcccgg gaccagtga acttgcaccg caagccccag 2820
gagctggact tctgcgtcct gaggccgtgc tga 2853

```

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa 50

```

<210> 4

<211> 50

7/27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg 50

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc 34

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc 29

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtctagag ccatgctttt gctgggcac ctaaccctgg ct 42

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

8/27

agagcggccg cctgctcctc ccggaagctc ttccggagg c 41

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagcacaggg tggatggttc ctgggcc 27

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcgcggccgc gcacggcctc aggacgcaga agtccag 37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

taggatcctt gtagaaactt cagaccatga caactcg 37

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggatcctc aatggtgatg gtagatgatga ccgaagcaga aggcattgtg ccgggacag 59

<210> 13

<211> 97

9/27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agcttgccac catgaagacg atcatcgccc tgagctacat cttctgccg gtattcgccg 60
actacaagga cgatgatgac aaggggatcc actagtc 97

<210> 14

<211> 97

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tgcgagactag tggatcccct tgcatcatc gtcctttag tcggcgaata ccaggcagaa 60
gatgtagctc agggcgatga tcgtcttcac ggtggca 97

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

acctcagcag ccagctccct tgtatacaca 30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cttgaggggg atggaccaat acagctttgg 30

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10/27

<400> 17

agagcggccg ctccagtcac cttcttgacg ctcttatt

38

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gcggacgagt ccatgggtcaa gttccac

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ttctgccagg cgcagaagtt gcgcagc

27

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actatagggc acgcgtggt

19

11/27

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

actgagcatc cggcgtcagg ttaggtaaa

30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

agtcctcctg aaatgctgtg atctgaaaaa

30

<210> 24

<211> 3473

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 24

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacatc gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatct gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctatgacctc 300
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600

12/27

taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgttctca 780
cacacagtcc tcccatatcc atacacatct tticatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccatat catccctttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagaggtc agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggtcatct tctgcccc aacccagct ctgatttgct tattcagggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggc tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860
tggtcaccgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctaccaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg 2040
tggtgtcgtg tgtctgtgtg cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca 2100
aggtaggagg atcaccggag gtcggtagtt cgagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc 2160
ctgtctttac taaaaataca aaattagctg ggcgtggttg tgcatgcctg taattccagc 2220
tacttgggag gctgagacag gagaatggct tgaaccggga aggcggagtt tgcggtgagc 2280
tgagatcgcg tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa 2340
aagaaatata tatatatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatgtata tatatatatg 2400
tatgtgtata tatatgtatg tgtgtgtgtg tgcatatata tatatacact ttgtttaatt 2460
gtaagtgtgt ttagtttaat ttttaataat gtccgtgatt aacagctggc tggcaagatt 2520
cctgagaact gaagagtttg cccagccca tccagcacac catgggcca gggcagacct 2580
tggggctagg cgtcttggg ttccagaggc ctcccatgcc cctgtcctat tgctcttctg 2640
gcaataggac atttacggg gggggggggg tggttcttga ttctgggtct tttaggggac 2700
tctgtgatta agaaacagca gggatgttgc aacagcaggg atgaggtggg cctggggagc 2760

13/27

```

ggtcagtgaagggtcttcat tcctagctgc tgacctgac tgccctgaga taaaagacta 2820
agaccagag agtgaacgct gtccgcgggg gcagaagcga gtgaggcgctc gggacagtgg 2880
ggcataacca agagcaaaac gcaaacctgag acttcagcgc cggtttctcg ggccagccca 2940
cgctctctgc ctacgtcaa tgccactccc tccccgcaa gtggctctcc gctctggagg 3000
cgggaccgag ttctccggtg gcccctggag gctccggcag cgagctctgg gaggctggga 3060
ggggagttaggggagggcg ctgactgggc cgtccaaaga ggagggggcc tttaataggc 3120
tcgcccagcg cctggcttgc tgcgctgcga gtggctgcgg ttgcgagaag ccgcccggca 3180
ccttccgcta gttctcggct gcaaatcttc gtccttgac ttgacagcga ttgtacttaa 3240
gctcccaggc cgcgcttgc ttggaaaggc acaggtagga agcgcgggct gccgggtgca 3300
cgctcgccgc cctgggagga gtctccctcc ctgggctctc ctttctggga actgccggct 3360
gtcccgtagc gttagcggtt ccagagtgcg ggctgcacgg agaccgcggc agcgcccgga 3420
gagcccggcc cagcccttc ccacagcgcg gcggtgcgt gcccgcgcc atg 3473

```

<210> 25

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 25

```

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtगतagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctगतctctc 300
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatagca gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctggccaaaa ccatgggtc agaatgaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780

```

cacacagtc tcccatatccc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcattgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccacat catccccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagtgtattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcctgcccc aaccccagct ctgatttgc taticagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggc tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgttg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattggcct agcgtgggtg 2040
cgtgtgtctg tggctcgagt tactcaggag accaaggtag gaggtaggaa accaaggtag 2100
gaggatcacc cgaggctggc agttcgagac cagcctgacc aacatggaga aaccctgtct 2160
ttactaaaaa tacaaaatta gctgggcgtg gtggtgcatg cctgtaattc cagctacttg 2220
ggaggctgag acaggagaat ggcttgaacc cggaaggcgg agtttgcggc gagctgagat 2280
cgcgctattg cactccagcc tgggcaacaa gagcaaaact ccgtctcaa aaaaaagaaa 2340
tatatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400
tatatatatg tatgtgtgtg tgtgtgcata tatatatata cactttgttt aattgtaagt 2460
gtgtttagtt taatttttaa taatgtccgt gattaacagc tggctggcaa gattcctgag 2520
aactgaagag ttgccccag cccatccagc acaccatggg ccagggcag acctggggc 2580
taggcggtct tgggttccag agggctccca tggccctgtc ctattgctct tctggcaata 2640
ggacatttac gggggggggg ggggtgggtc ttgattctgg gtcctttagg ggactctgtg 2700
attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760
tgaagggtct tcattcctag ctgctgacct gatctgccct gagataaaag actaagaccc 2820
agagagtga cgctgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880
accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggttt ctggggccag cccacgcctc 2940

ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgctctg gaggcgggac 3000
cgagtctcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
tgaggggagg ggcgctgact gggccgtcca aagaggaggg ggccctttaat aggctcgccc 3120
agcgccctggc ttgctgcgtt gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180
gctagtcttc ggctgcaaat ctctgtcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240
agggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgcg ggctgccggg tgcacgctcg 3300
ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtccc 3360
tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420
ggcccagccc ctccacag cgcgcggtg cgctgcccg cgccatg 3467

<210> 26

<211> 3464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 26

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtc tgtaatatit gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300
aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagti tctgtgtca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaag 600
taaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgtc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtgtca 780
cacacagtcc tccataccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttcagctcc ttgtgtcca atcaaggaga ggctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960

ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttcactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctccttggac aatagagttc ttcctttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccat catcccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctccttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tcccagtc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcctgcccc aaccccagct ctgatttgct tattcagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccatttg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcgg tctgggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
tggtcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgtc 2040
tgtgtctgtg gtgcagtta cttaggagac caaggtagga gtaggaaac caaggtagga 2100
ggatcacccg aggtcggtag ttcgagacca gccgaccaa catggagaaa ccctgtcttt 2160
actaaaaata caaaattagc tgggcgtggg ggtgcatgcc tgtaattcca gctacttggg 2220
aggctgagac aggagaatgg ctgaacccg gaaggcggag ttgcggtga gctgagatcg 2280
cgtcattgca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340
tatatatata tatgtgtgtg tigtgtgtg tigtgtatg tatatatata tatgtatgtg 2400
tatatatatg tatgtgtgtg tigtgtcata tatatataca cttgttttaa ttgtaagtgt 2460
gtttagttaa atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttcttgagaa 2520
ctgaagagtt tgcctcagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac cttggggcta 2580
ggcggctctg ggttccagag ggcctccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640
acatttacgc gggggggggg gtggttcttg attctgggtc ttttagggga ctctgtgatt 2700
aagaaacagc agggatgttg caacagcagg gatgagggtg gcctggggac gggtcagtga 2760
agggtcttca ttcttagctg ctgacctgat ctgccctgag ataaaagact aagaccaga 2820
gagtgaaacg tgtccgagg ggacagaagc agtgaggcgt cgggacagtg gggcataacc 2880
aagagcaaaa cgcaaaactga gacttcagcg ccggtttctc gggccagccc acgcctcctg 2940
cctcagctca atgccactcc ctcccgcga agtggtctc cgctctggag gcgggaccga 3000
gttctccgtt gggccctgga ggcctcggca gcgagctctg ggaggctggg aggggagtga 3060
ggggaggggc gctgactggg ccgtccaaag agggaggggc ctttaatagg ctgcgccagc 3120

17/27

gcctggcttg ctgcgctgcg agtggctgcg gttgcgagaa gccgcccggc accttccgct 3180
 agttctcggc tgcaaatctt cgtccittgca cttgacagcg attgtactta agctcccagg 3240
 gcgcgctttg cttggaaaagg cacaggtagg aagcgcgggc tgccgggtgc acgctcgccg 3300
 ccctgggagg agtctccctc ccttggctct ctttcttggg aactgccggc tgtcccgtag 3360
 cgttggcggg tccagagtgc gggctgcacg gagaccgagg cagcggccgg agagcccggc 3420
 ccagcccctt cccacagcgc ggcgggtgcgc tgcccggcgc catg 3464

<210> 27

<211> 3469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 27

ttgcacagct aagatctggg ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatat gacctggtcg 120
 ttatcttagg tattaatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
 gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
 gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctagatcctc 300
 aattccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
 ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
 atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgtcga ggggtgagaa 480
 tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
 ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc cttgccaaaa cccatgggtc agaataaag 600
 taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
 tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
 taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact cctgtgtcga 780
 cacacagtcc tcccatacc atacactctc ttctatttgc agagtataaa caccatctc 840
 tcactcattc acataatgaa tticagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
 gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
 ggatccctta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtct ttacttgatg gaccagtccc 1020
 agccttttct ctccctggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
 attccaaaat tctcccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140

tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcccttgct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttggg caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttcctct 1500
tgtaactgca gcccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcttgcccc aaccccagct ctgatttgct taitcagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta ttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggt ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc ctagcgtggg 2040
gtcgtgtgtc tgtgttcgca gttactcagg agaccaagggt aggaggtagg aaaccaagggt 2100
aggaggatca cccgaggctg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160
ctttactaaa aatacaaaat tagctgggag tgggtgtgca tgcctgtaat tccagctact 2220
tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280
atcgcgtcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340
aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtatatata tatatgtatg 2400
tgtatatata tgtatgtgtg tgtgtgtgca tatatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460
gtgtgtttag ttttaatttt aataatgtcc gtgatttaca gctggctggc aagattcctg 2520
agaactgaag agtttgcctc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccctggg 2580
gctaggcggt ctggggttcc agagggtcc catgcccctg tcctattgct ctcttgcaa 2640
taggacattt acgcgggggg ggggggtggg tcttgattct gggtctttta ggggactctg 2700
tgattaaaga acagcaggga tgttgcaaca gcagggatga ggtgggcctg gggacgggtc 2760
agtgaagggt cttcatctct agctgctgac ctgatctgcc ctgagataaa agactaagac 2820
ccagagagtg aacgctgtcc gcgggggcag aagcgagtga ggctcggga cagtggggca 2880
taaccaagag caaacgcaa actgagactt cagcgccggt ttctcgggcc agcccacgcc 2940
tcttgccctc gctcaatgcc actccctccc cgccaagtgg ctctccgctc tggaggcggg 3000
accgatttct ccggtggccc ctggaggctc cggcagcgag ctctgggagg ctgggagggg 3060
agtgaaggga ggggcgctga ctgggcccgtc caaagaggag ggggccttta ataggctcgc 3120
ccagcgcttg gcttgctgag ctgcgagtgg ctgcggttgc gagaagccgc ccggcacctt 3180
ccgctagttc tcggctgcaa atcttctgtc ttgcacttga cagcgattgt acttaagctc 3240
ccagggcgag ctttgcttgg aaaggcacag gtaggaagcg cgggctgccg ggtgcacgct 3300

19/27

cgccgcccctg ggaggagtct cctcccttg gctctccttt ctgggaactg ccggctgtcc 3360
 cgtagcgttg gcggttccag agtgcgggct gcacggagac gcgggcagcg gccggagagc 3420
 ccggcccagc ccttccac agcgcgcggtg tgcgtgccc ggcgccaig 3469

<210> 28

<211> 3470

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 28

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60
 tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctg 120
 ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
 gagctaggat accccttctc ttgtgacaga cgagtcagag aatcagatca gtgatagaag 240
 tggagtgcc aacctgagta tcacctctac tcaagtgtc aacatatccc tagatcctca 300
 attccctggc aaaagtgtat ggatggaacc acaggcttcc aagaggggac agtcaagcat 360
 taaatacgag aatgcacata taactcttgg tgcaatgttt agcacatact aagcctgcaa 420
 tacatgctaa tccctttgag caaatccaca tggccagitt ctgtgtctag ggggtgagaat 480
 agctgggctg tgattggggc agggggagca ctaagtggga gggacttctt gtctcaggtc 540
 cctgccatct tgactgacat gctgcagccc ttgccaaaac ccatgggtca gaatgaaagt 600
 aaagtgccgt tgaaaacctt gcaatccacc tttaaaactg ccgggtgtag taaaacaatt 660
 gcttgcccca aataaatgac ttatcattgc tgttgggtgt ctgcgtttct ctttaattat 720
 aggccctctt tgaacgtca aacacacagg gcctttgtaa gcttgaactc cctgtctcac 780
 acacagtcct cccataccca tacactctct ttcatattga gagtataaac acccatctct 840
 cactcattca cataatgaat ttcagctcct tgtgtcccaa tcaaggagag gcctcactgg 900
 aattatgggc atctgagcca tcttcatgtt ccaaggcccc agggggcgct tccaagagt 960
 gatcctttat ggggagaaga taatgggcaa aaagtgtct tcaatgatgg accagtccca 1020
 gccttttctc tccttggaac atagagtctt tcccttgaa agccacttcc ctaaaaaaaaa 1080
 ttccaaaatt ctccacatc atcccttta tgccttaaat catcacacac tcccttcttt 1140
 gtctccctt cttgcaaaact caactcagag cctttggct ccagaaagat ttcttaggta 1200
 tcaggagaga gtagcaaagc ctccctctc tccttgctt tctccctgt cagagaaaga 1260
 agttgattct gcggagaggt aagaaggatc ttgaggtcta gagcctgaaa aactccttgg 1320

gctgttctcc aaactagatg ggaacataag gtgcgattgc atcttctcca gctgatactc 1380
actcggcctc ctatgccagt cccaggtcca gggtttggtc aagggtcaaa tgagataatt 1440
tcatggagga agcctggccc gatttttcta ctgtttgctg gaagacagcc tcttctctt 1500
gtaactgcag cccagaacc tgatctccac atccctgcc ggcaggtagc tgtgtacaag 1560
ggctcatctt cctgccccca acccagctc tgatttgctt attcaggtgg tgaataact 1620
tctaccagga cctatttcaa gccattgtga tgtccctgac tggggagatg cagggcagca 1680
caccatttaa tatttccctc acatttccac cccattctgc actcttttct gggagttgct 1740
gtctcagagg gttggcggtt ctggtggctc aagaccataa gtaattatca aatacttagg 1800
aagcgacggg ttttgagtat ttattacctt ttaaaaatgt actttgtggc taggcatggt 1860
ggctcacgcc tgtagtcccc gcaccgggag gccgaggtgg gtggattgct tgagctcagg 1920
agttcaagac cagcctgggc aacacggcga aaccagctc ctacaaaaa tacacacaca 1980
cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caaattggcc tagcgtgggtg 2040
tcgtgtgtct gtggtcgag ttactcagga gaccaaggta ggaggtagga aaccaaggta 2100
ggaggatcac ccgaggtcgg tagttcgaga ccagcctgac caacatggag aaacctgtc 2160
tttactaaaa atacaaaatt agctgggcgt ggtggtgcat gcctgtaatt ccagctactt 2220
gggaggctga gacaggagaa tggcttgaac ccggaaggcg gagtttgcgg tgagctgaga 2280
tcgcgtcatt gcactccagc ctgggcaaca agagcaaac tccgtctcaa aaaaaagaa 2340
atatatatat atatgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gtatatatat atatgtatgt 2400
gtatatatat gtatgtgtgt gtgtgtgcat atatatatat acactttgtt taattgtaag 2460
tgtgtttagt ttaattttta ataattgtccg tgattaacag ctggctggca agattcctga 2520
gaactgaaga gtttgcccca gcccatccag cacaccatgg gcccagggca gaccttgggg 2580
ctaggcggtc ttgggttcca gagggctccc atgcccctgt cctattgtc tcttggcaat 2640
aggacattta cgcggggggg gggggggtgg ttcttgattc tgggtctttt aggggactct 2700
gtgattaaga aacagcaggg atgttgcaac agcagggatg aggtgggcct ggggacgggt 2760
cagtgaaggg tcttcatcc tagctgtga cctgatctgc cctgagataa aagactaaga 2820
cccagagagt gaacgtgtc cgcgggggca gaagcgagt aggcgtcggg acagtggggc 2880
ataaccaaga gcaaaacgca aactgagact tcagcgccgg ttctcgggc cagcccacgc 2940
ctcctgcctc agctcaatgc cactccctcc ccgccaagt gctctccgt ctggaggcgg 3000
gaccgagttc tccggtggcc cctggaggct ccggcagcga gctctgggag gctgggaggg 3060
gagtgagggg aggggcgctg actgggccgt ccaaagagga gggggcctt aataggctcg 3120
cccagcgctt ggcttgcgtc gctgcgagt gctgcggtt cgagaagccg cccggcacct 3180
tccgctagtt ctcggtgca aatcttcgtc ctgacattg acagcgattg tacttaagct 3240
cccagggcgc gctttgctt gaaaggcaca ggtaggaagc gcgggtgcc ggggtcacgc 3300
tcgccgccct gggaggagtc tccctccctt ggctctcctt tctgggaact gccggctgtc 3360
ccgtagcggtt ggcggttcca gagtgcgggc tgcacggaga ccgcggcagc ggccggagag 3420
cccgccccag ccccttccca cagcgggcg gtgcgtgcc cggcgccatg 3470

<210> 29

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 29

```
ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatTT gacctggctcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300
aatcccttgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgtctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaatgaaag 600
taaaagtgcg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780
cacacagtcc tcccatacct atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaaa 1080
attccaaaat tctccacat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttgaggctt agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgtt ggaagacagc ctcttctct 1500
```

tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcctgcccc aacccagct ctgatttgct taticagggtg gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggc caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta ttatttacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaaattggc cttagcgtggt 2040
gtcgtgtgtc tgtggtcgca gttactcagg agaccaaggt aggaggtagg aaaccaaggt 2100
aggaggatca cccgaggtcg gtagttcgag accagcctga ccaacatgga gaaaccctgt 2160
ctttactaaa aatacaaaa tagctgggcg tgggtggtgca tgcctgtaat tccagctact 2220
tgggaggctg agacaggaga atggcttgaa cccggaaggc ggagtttgcg gtgagctgag 2280
atcgctcat tgcactccag cctgggcaac aagagcaaaa ctccgtctca aaaaaaaga 2340
aatatatata tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta 2400
tgtgtatata tatgtatgtg tgtgtgtgtg catatatata tacactttgt ttaattgtaa 2460
gtgtgtttag tttattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggctggc aagattcctg 2520
agaactgaag agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg 2580
gctaggcggg cttagggttcc agagggtcc catgcccctg tcctattgct cttctggcaa 2640
taggacattt acgcgggggg ggggtggttc ttgattctgg gtcttttagg ggactctgtg 2700
attaagaaac agcagggatg ttgcaacagc agggatgagg tgggcctggg gacgggtcag 2760
tgaagggtct tcatccttag ctgctgacct gatctgccct gagataaaaag actaagaccc 2820
agagagtga cgcgtccgc gggggcagaa gcgagtgagg cgtcgggaca gtggggcata 2880
accaagagca aaacgcaaac tgagacttca gcgccggttt ctccggccag cccacgcctc 2940
ctgcctcagc tcaatgccac tccctccccg ccaagtggct ctccgtctg gaggcgggac 3000
cgagttctcc ggtggccctt ggaggctccg gcagcgagct ctgggaggct gggaggggag 3060
tgaggggagg ggcgtgact gggccgtcca aagaggaggg ggcctttaat aggcctgccc 3120
agcgcttggc ttgctgcgt gcgagtggct gcggttgca gaagccgccc ggcaccttcc 3180
gctagtctc ggctgcaaat ctctgcctt gcacttgaca gcgattgtac ttaagctccc 3240
aggcgcgct ttgcttgaa aggcacaggt aggaagcgc ggctgccggg tgcacgtcg 3300
ccgccctggg aggagtctcc ctcccttggc tctcctttct gggaactgcc ggctgtcccg 3360
tagcgttggc ggttccagag tgcgggctgc acggagaccg cggcagcggc cggagagccc 3420
ggcccagccc ctccccacag cgcggcgggt cgctgcccgg cgccatg 3467

<210> 30

<211> 3462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222>

<400> 30

```
ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgacat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggctc 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgt caacatatcc ctagatcctc 300
aatccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagaggga cagtcaagca 360
ttaaatcaga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atcccttga gcaaatccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg cagggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgctgcagcc ctigccaaaa ccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgccg ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcatig ctgttggttg tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccctct ttgaacgctc aaacacacag ggcctttgta agcttgaact ccctgtctca 780
cacacagtc tcccatacc atacactctc ttcatattgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa ttccagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccttta tggggagaag ataatgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccttttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctcccat catcccttt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcccttgcc ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttagagttc agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtc agggtttgg caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtaactgca gccccagaac ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcttcccccc aacccagct ctgatttgct tattcagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
```

acaccatttta atatttccct cacatttcca cccatttctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggg tctgggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tacttttggtg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgagggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920
gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacaa attggcctag cgtgggtgtcg 2040
tgtgtctgtg gtgcgagtta ctgaggagac caaggtagga ggtaggaaac caaggtagga 2100
ggatcacccg aggtcgttag ttgcgagacca gcctgaccaa catggagaaa ccctgtcttt 2160
actaaaaata caaaattagc tgggcgtggg ggtgcatgcc tgaattcca gctacttggg 2220
aggctgagac aggagaatgg ctggaacccg gaaggcggag ttgccggtga gctgagatcg 2280
cgtcatgtca ctccagcctg ggcaacaaga gcaaaactcc gtctcaaaaa aaaagaaata 2340
tatatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtatgta tatatatata tgtatgtgta 2400
tatatatgta tgtgtgtgtg tgtgcatata tatatatata ctttgtttta ttgtaagtg 2460
gttttagttta atttttaata atgtccgtga ttaacagctg gctggcaaga ttcctgagaa 2520
ctgaagagtt tgccccagcc catccagcac accatgggcc cagggcagac ctgggggcta 2580
ggcgggtcttg ggttccagag ggctcccatg cccctgtcct attgctcttc tggcaatagg 2640
acatttacgc gggggggggg ggttcttgat tctgggtcct ttaggggact ctgtgattaa 2700
gaaacagcag ggatgttgca acagcagggg tgagggtgggc ctggggacgg gtcagtgaag 2760
ggtcttcatt cctagctgct gacctgatct gccctgagat aaaagactaa gaccagaga 2820
gtgaacgctg tccgcggggg cagaagcgag tgaggcgtcg ggacagtggg gcataaccaa 2880
gagcaaaacg caaactgaga ctccagcgcc ggtttctcgg gccagccac gcctcctgcc 2940
tcagctcaat gccactccct ccccgccaag tggctctccg ctctggaggc gggaccgagt 3000
tctccgggtg cccctggagg ctccggcagc gagctctggg aggctgggag gggagtgagg 3060
ggagggggcg tgactgggcc gtccaaagag gagggggcct ttaataggct cgcccagcgc 3120
ctggcttgct gcgctgcgag tggctgcggt tgcgagaagc cgcccggcac ctccgctag 3180
ttctcggctg caaatcttcg tccttgact tgacagcgt tgtacttaag ctccagggc 3240
gcgctttgct tggaaaggca caggtaggaa gcgcgggctg ccgggtgcac gctcggccg 3300
ctgggaggag tctccctccc ttggctctcc ttcttgggaa ctgccggctg tccgtagcg 3360
ttggcgggtc cagagtgcgg gctgcacgga gaccgcggca gcggccggag agcccgggc 3420
agccccctcc cacagcgcg ggtgcgctg cccggcgcca tg 3462

<210> 31

<211> 3455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

25/27

<221> promoter

<222>

<400> 31

ttgcacagct aagatctggt ggaggcatgc acacagggcc ctctgaccat gggctctaaa 60
tcactgtact atgttccctt ccataggcct caatcagtca tgtaatatit gacctggtcg 120
ttatcttagg tattatctag accacagatt ttggatgcag ttctctggct gaagacctct 180
gagctaggat aaccccttct cttttgacag acgagtcaga gaatcagatc agtgatagaa 240
gtggagtgcc aatcctgagt atcacctcta ctcaagtgc caacatatcc ctgatcctc 300
aatccctgg caaaagtgat tggatggaac cacaggcttc caagagggga cagtcaagca 360
ttaaatacga gaatgcacat ataactcttg gtgcaatgtt tagcacatac taagcctgca 420
atacatgcta atccctttga gcaaattccac atggccagtt tctgtgctca ggggtgagaa 480
tagctgggct gtgattgggg caggggggagc actaagtggg agggacttcc tgtctcaggt 540
ccctgccatc ttgactgaca tgcctgcagcc ctggccaaaa cccatgggtc agaataaaag 600
taaagtgcgc ttgaaaacct tgcaatccac ctttaaaact gccgggtgta gtaaaacaat 660
tgcttgcccc aaataaatga cttatcattg ctgttgggtt tctgcgtttc tctttaatta 720
taggccccct ttgaacgctc aaacacacag ggcccttgta agcttgaact cctgtctca 780
cacacagtcc tcccataccc atacactctc tttcatttgc agagtataaa caccatctc 840
tcactcattc acataatgaa tttcagctcc ttgtgtccca atcaaggaga ggcctcactg 900
gaattatggg catctgagcc atcttcatgt tccaaggccc cagggggcgc ttccaagagt 960
ggatccctta tggggagaag ataattgggca aaaagtgtc ttactgatg gaccagtccc 1020
agccctttct ctcttggac aatagagttc ttcccttgaa cagccacttc cctaaaaaaa 1080
attccaaaat tctccacat catccccctt atgcttaaaa tcatcacaca ctcccttctt 1140
tgtcctcccc tcttgcaaac tcaactcaga gccctttggc tccagaaaaga ttttctaggt 1200
atcaggagag agtagcaaag cctccctcct ctcttgcct ttctcccttg tcagagaaag 1260
aagttgattc tgcggagagg taagaaggat cttaggtct agagcctgaa aaactccttg 1320
ggctgttctc caaactagat gggaacataa ggtgcgattg catcttctcc agctgatact 1380
cactcggcct cctatgccag tccccagtcc agggtttggc caagggtcaa atgagataat 1440
ttcatggagg aagcctggcc cgatttttct actgtttgct ggaagacagc ctcttctct 1500
tgtaactgca gccccagAAC ctgatctcca catccctgcc aggcaggtag ctgtgtacaa 1560
gggctcatct tcttgcccc aaccccagct ctgatttgc tttcagggt gtgtaaatac 1620
ttctaccagg acctatttca agccattgtg atgtccctga ctggggagat gcagggcagc 1680
acaccattta atatttccct cacatttcca cccattctg cactcttttc tgggagttgc 1740
tgtctcagag ggttggcggg tctggtggct caagaccata agtaattatc aaatacttag 1800
gaagcgacgg gttttgagta tttattacct tttaaaaatg tactttgtgg ctaggcatgg 1860
tggctcacgc ctgtagtccc cgcaccggga ggccgaggtg ggtggattgc ttgagctcag 1920

26/27

gagttcaaga ccagcctggg caacacggcg aaaccagtc tctacaaaa atacacacac 1980
acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat tggcctagcg tgggtgctgtg 2040
tgtctgtggt cgcagttact caggagacca aggtaggagg taggaaacca aggtaggagg 2100
atcaccgag gtcggtagt ctagaccagc ctgaccaaca tggagaaacc ctgtctttac 2160
taaaaataca aaattagctg ggcgtggtgg tgcattgcctg taattccagc tacttggggag 2220
gctgagacag gagaatggct tgaacccgga aggcggagtt tgcgggtgagc tgagatcgcg 2280
tcattgcact ccagcctggg caacaagagc aaaactccgt ctcaaaaaaa aaaaaatata 2340
tatatatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtatata tatatatgta tgtgtatata 2400
tatgtatgtg tgtgtgtgca tatatatata tacactttgt ttaattgtaa gtgtgttttag 2460
tttaattttt aataatgtcc gtgattaaca gctggcctggc aagattcctg agaactgaag 2520
agtttgcccc agcccatcca gcacaccatg ggcccagggc agaccttggg gctaggcggg 2580
cttgggttcc agagggtcc catgccccgt tcctattgct cttctggcaa taggacattt 2640
acgcgggggg ggtggttctt gattctgggt cttttagggg actctgtgat taagaaacag 2700
cagggatgtt gcaacagcag gcatgagggt ggccctgggga cgggtcagtg aagggtcttc 2760
attcctagct cctgacctga tctgccctga gataaaaagac taagaccag agagtgaacg 2820
ctgtccgcgg gggcagaagc gattgaggcg tcgggacagt ggggcataac caagagcaaa 2880
acgcaaaactg agacttcagc gccggtttct cgggccagcc cacgcctcct gcctcagctc 2940
aatgccactc cctccccgcc aagtggctct cgcctctgga ggcgggaccg agttctccgg 3000
tggccccctg aggcctccggc agcgagctct gggaggctgg gaggggagtg aggggagggg 3060
cgctgactgg gccgtccaaa gaggaggggg cctttaatag gctcgcccag cgcctggctt 3120
gctgcgctgc gattggctgc ggttgcgaga agccgccggg caccttccgc tagttctcgg 3180
ctgcaaatct tcttccttgc acttgacagc gattgtactt aagctcccag ggcgcgcttt 3240
gcttggaaag gcacaggtag gaagcgcggg ctgccgggtg cacgctcgcc gccctgggag 3300
gagtctccct cccttggctc tcctttctgg gaactgccgg ctgtcccgta gcgttggcgg 3360
ttccagagtg cgggctgcac ggagaccgcg gcagcgcccg gagagcccgg cccagcccct 3420
tcccacagcg cggcgggtgc ctgcccgcg ccatg 3455

<210> 32

<211> 11

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Gly ser Val Val Leu thr Ala Lys Cys

1

5

10

27/27

<210> 33

<211> 13

<212> Peptide

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ser Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

10

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

agagcggccg cctgctggct cagggtag ctggcgcc

38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

agagcggccg cggaaccatc caccctgtgc ttgttgag

38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Flannery CR et al., "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage," Biochem Biophys Res Commun. Vol. 260 (July 1999) pp.318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. Vol. 274 (August 1999) pp.23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al., "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." Science. Vol. 284 (June 1999) pp.1664-6.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 February, 2001 (06.02.01)

Date of mailing of the international search report

06 March, 2001 (06.03.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/07917

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/34, A61K 38/48, A61P 19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Flannery CR et al. "Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage." Biochem Biophys Res Commun. 第260巻 (1999 Jul) p. 318-22.	1-11
X	Abbaszade I et al. "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family." J Biol Chem. 第274巻 (1999 Aug) p. 23443-50.	1-11
X	Tortorella MD et al. "Purification and cloning of aggrecanase -1: a member of the ADAMTS family of proteins."	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.02.01

国際調査報告の発送日

06.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Science. 第284巻 (1999 Jun) p. 1664-6.	

